

LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE L'INTESTIN

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le octobre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

SIMONE BESSE DE LAROMIGUIÈRE

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

née à Fraisses (Loire), le 9 Septembre 1917

Examineurs de la Thèse	{	MM. J. ROCHE, <i>Président.</i>	}	<i>Assesseurs.</i>
		NICLOUX, <i>Prof. Fac. Méd. Strasbourg.</i>		
		MERCIER, <i>Professeur.</i>		
		P. DUBOULOZ, <i>Professeur.</i>		

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1942

LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE L'INTESTIN

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le octobre 1942

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

SIMONE BESSE DE LAROMIGUIÈRE

ANCIENNE ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

née à Fraisses (Loire), le 9 Septembre 1917

Examineurs de la Thèse	{	MM. J. ROCHE, <i>Président.</i>	}	<i>Assesseurs.</i>
		NICLOUX, <i>Prof. Fac. Méd. Strasbourg.</i>		
		MERCIER, <i>Professeur.</i>		
		P. DUBOULOZ, <i>Professeur.</i>		

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

—
1942



PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : F. MERCIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, AUBARET, COTTE

Chargés de cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mme PEROL.

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	MONGES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	N...
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie chirurgicale.....	MOIROUD
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	MALMÉJAC
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO
Professeur sans chaire.....	POURSINES
Professeur sans chaire.....	DUBOULOZ
Professeur sans chaire.....	SAUTET

Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI	MM. FIGARELLA	MM. IMBERT
CARCASSONNE	PAILLAS	AUDIER
BERTHIER	ARNOUX	CHOSSON
BALANSARD	DELPHAUT	DOR
BRAHIC		RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Chimie minérale.....	ARNOUX
Chimie organique.....	DUMAZERT
Clinique des maladies contagieuses.....	PERIOT
Médecine opératoire	DOR
Microbiologie.....	BOYER
Neuro-Chirurgie	ARNAUD
Obstétrique.....	CHOSSON
Pharmacodynamie aux Pharmaciens	DELPHAUT
Psychiatrie	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT
Clinique gynécologique	FIGARELLA
Clinique chirurgicale infantile.....	R. IMBERT
Clinique stomatologique	ACHARD

A LA CHÈRE MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON ONCLE F. ROUSSEL-DESPIERRES.

A MA MÈRE

A MES FRÈRE ET SŒURS

Avec toute mon affection.

A MON MAÎTRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN ROCHE

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

*Ma très respectueuse et profonde
reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. NICLOUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'INSTITUT DE FRANCE.

MEMBRE ASSOCIÉ DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

A MON JURY DE THÈSE

A MON AMIE ALICE LAURENS

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION	13
PREMIÈRE PARTIE.	
Biochimie générale des phosphatases et système phosphatasique de la muqueuse intestinale	15
I. EXISTENCE ET RÉPARTITION DES SYSTÈMES PHOSPHATASI- QUES DANS LES TISSUS ET LES HUMEURS DES ANIMAUX...	15
II. DIVERSITÉ DES PHOSPHATASES. CLASSIFICATION DE FOLLEY et KAY	18
A. Classification	18
B. Facteurs modifiant l'activité phosphatasique....	20
1. Température	20
2. Ion H^+	20
3. Activateurs spécifiques	21
a) ion Mg^{++}	21
b) autres activateurs	22
4. Inhibiteurs spécifiques	22
5. Action sur les α - et β -glycérophosphates....	23
III. LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE L'INTESTIN	24
A. Existence d'un système phosphatasique dans la muqueuse intestinale	24
B. Etude de la phosphomonoestérase et de la pyro- phosphatase intestinales	27
1. Système phosphomonoestérasique	27
a) Purification	27
b) Spécificité	28
c) Activateurs	29
d) Inhibiteurs	30
2. Système pyrophosphatasique	31
a) Essais de purification	32
b) Activateurs	32
c) Inhibiteurs	33
IV. OBJET DU TRAVAIL	34

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur le système phosphatasique de la muqueuse intestinale	35
--	----

CHAPITRE I.

DESCRIPTION GÉNÉRALE DU SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE	37
A. Matériel d'étude	37
B. Action de la phosphomonoestérase et de la phosphodiesterase brutes sur divers esters.....	39
1. Détermination du pH optimum d'action.....	39
Phosphomonoestérase A ₁	39
Phosphodiesterase	40
Pyrophosphatase	41
2. Action de l'ion Mg ⁺⁺	42
3. Action des réducteurs et de corps dérivés..	43
a) Acide ascorbique et déhydroascorbique.	44
Acide ascorbique	44
Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium	44
Lyoenzyme	44
Desmoenzyme	45
Hydrolyse du méthylphosphate de sodium	45
Hydrolyse du pyrophosphate de sodium	46
Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium	47
Acide déhydroascorbique	48
Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium	48
Hydrolyse du pyrophosphate de sodium	48
Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium	48
b) Cystéine et cystine	49
Cystéine	50
Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium	50
Lyoenzyme	50
Desmoenzyme	52
Hydrolyse du méthylphosphate de sodium	53
Hydrolyse du pyrophosphate de sodium	53
Cystine	53
c) Glutathion (G-SH)	54
Hydrolyse du β-glycérophosphate de sodium	54
Hydrolyse du pyrophosphate de sodium	54

Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium	55
d) Hydrogène sulfuré	55
e) Sulfite de sodium	55
f) Cyanure de potassium	56
4. Action des Oxydants	57
a) Acide monoiodacétique	58
b) Eau oxygénée	58
c) Iode	59
5. Autres activateurs et inhibiteurs divers.....	60
a) Oxalate de potassium	60
b) Fluorure de sodium	61
c) Acide cholique	61
d) Glycocolle	62
e) Zn^{++} et alanine	62
f) Ion $PO_4^{=}$	65
Conclusions	65

CHAPITRE II.

ESSAIS DE PURIFICATION DES PHOSPHATASES DE LA MUQUEUSE INTESTINALE	67
1. Adsorption et élution	68
a) Kaolin	68
b) Cholestérol	70
c) Acide stéarique	71
d) Pyrophosphate d'argent	71
2. Chauffage à divers pH et à diverses tempé- ratures	72
Lyoenzymes	72
Desmoenzymes	74
3. Précipitation fractionnée des enzymes par l'acétone ou l'alcool	75
Conclusions	77

CHAPITRE III.

CARACTÈRES DES PHOSPHATASES INTESTINALES PURIFIÉES..	79
1. Action du magnésium	80
2. Action des réducteurs, et de corps dérivés...	81
a) Acides ascorbique et déhydroascorbique	81
Acide ascorbique	81
Acide déhydroascorbique	84
b) Cystéine et cystine	84
Cystéine	84
Cystine	85

<i>c)</i> Glutathion (G-SH)	86
<i>d)</i> Cyanure de potassium	87
3. Action des oxydants	88
<i>a)</i> Acide monoiodacétique	89
<i>b)</i> Eau oxygénée	89
<i>c)</i> Ferri cyanure de potassium	89
<i>d)</i> Perborate de sodium	90
4. Action d'autres activateurs et inhibiteurs divers	90
<i>a)</i> Oxalate de potassium	90
<i>b)</i> Fluorure de sodium	91
<i>c)</i> Acide cholique	91
<i>d)</i> Glycocolle	92
<i>e)</i> Ion $\text{PO}_4^{\equiv}$	93
5. Spécificité de la phosphoestérase purifiée..	93
Conclusions	95
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	99
BIBLIOGRAPHIE	103

INTRODUCTION.

Les esters phosphoriques et les dérivés pyrophosphoriques, très répandus dans les règnes animal et végétal, participent à d'importantes réactions biologiques mettant en jeu leur formation ou leur dédoublement grâce à des catalyseurs spécifiques : *les phosphatases*.

Les premiers travaux poursuivis sur ces enzymes ont été entrepris par des biochimistes japonais : SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI [94] qui mirent en évidence l'existence dans la nature d'enzymes dédoublant les esters phosphoriques et hydrolysant les pyrophosphates. Par la suite, ROBISON (1923), découvrit la phosphatase des os et entreprit des recherches sur son rôle dans l'ossification ; ses recherches inaugurent l'ère moderne de la biochimie des phosphatases. Avec KAY [52], ROBISON s'attacha à l'étude détaillée de ces enzymes, de leurs caractères de leur mode d'action et, depuis lors, de très nombreux travaux ont été consacrés aux phosphatases.

La première partie de cet exposé résume les principales données établies sur ces enzymes, lesquelles ont déjà fait l'objet de mises au point d'ensemble d'ALBERS [1], de COURTOIS [27], de FOLLEY et KAY [37], de LATREILLE [65], d'OPPENHEIMER [74], auxquelles nous nous sommes souvent utilement reporté. Elle contient, en outre, une étude plus détaillée des travaux antérieurs sur les phosphatases intestinales, au sujet desquelles nous avons poursuivi des recherches exposées dans la seconde partie de ce travail.

Nos expériences ont été poursuivies en collaboration avec Mademoiselle Alice LAURENS, de même que celles faisant l'objet de sa thèse de doctorat en pharmacie. De ce fait, un certain nombre des unes et des autres sera exposé à la fois dans la thèse de Mlle LAURENS « Sur les activateurs et les inhibiteurs des phosphatases alcalines » et dans la nôtre.

PREMIÈRE PARTIE.

Biochimie générale des phosphatases et système phosphatasique de la muqueuse intestinale.

ÉTUDE GÉNÉRALE DES PHOSPHATASES ANIMALES ET TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE L'INTESTIN.

I. — *EXISTENCE ET RÉPARTITION DES SYSTÈMES PHOSPHATASIQUES DANS LES TISSUS ET LES HU- MEURS DES ANIMAUX.*

On rencontre des phosphatases chez de nombreux invertébrés marins ou terrestres [73], chez divers crustacés [84], chez les poissons téléostéens et sélaciens [19], les reptiles [102], les oiseaux [20-25], et chez de très nombreux mammifères.

KAY [52], a résumé les données obtenues sur les activités relatives de la « glycérophosphatase » des divers tissus du Chat, de l'Homme, du Lapin et du Rat. Il résulte de ses recherches et de celles de Mac FARLANE, PATTERSON et ROBISON [67] que la plupart des tissus des mammifères contiennent des quantités appréciables d'une phosphatase qui hydrolyse les monoesters de l'acide orthophosphorique à un pH optimum voisin de 9.0. Selon leur degré d'activité, les tissus peuvent être divisés en trois groupes :

On trouvera un ensemble de données sur les phosphatases des invertébrés marins dans la thèse de doctorat ès-sciences de P. MANIGAULT [68 bis] et sur les phosphatases des poissons dans les travaux de BAKWIN et BODANSKY [19], de ROCHE et BULLINGER [88 bis].

Le premier, le plus actif, comprend, dans un ordre décroissant d'activité : la muqueuse intestinale, les glandes mammaires, la partie corticale du rein, les os, et les poumons. Le placenta (REIS [80]), la prostate [52], et la rétine [29], présentent également une forte activité phosphatasique.

Le deuxième groupe, inactif ou légèrement actif, comprend : les muscles, le sang, les artères, les cartilages ne s'ossifiant pas.

Le troisième, d'activité intermédiaire, comprend : la glande thyroïde, la rate et le foie. Depuis les travaux de ROBISON et KAY passés en revue par ce dernier, on a mis en évidence l'existence dans de nombreux tissus de plusieurs phosphatases, celle de pH optimum = 9,0 étant souvent accompagnée d'une autre, de pH optimum = 5,2 (BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [13]), (BAMANN et DIEDERICH [5]) et d'une troisième, de pH optimum très voisin de 4 (BAMANN).

Par ailleurs, des pyrophosphatases hydrolysant l'acide pyrophosphorique accompagnent le plus souvent les enzymes actifs sur des esters phosphoriques, en sorte que les organes animaux doivent être considérés comme renfermant non pas une phosphatase, mais des *systèmes phosphatasiques*. C'est ainsi que le foie renferme les trois estérases dont les pH optimum d'action viennent d'être signalés (BAMANN), et que le cerveau renferme les deux premiers (CEDRANGOLO [22]; GIRI et DATTA [40]) l'os ne paraissant renfermer que l'enzyme de pH optimum 9,0 (ROSSI [91]).

On rencontre dans les hématies trois phosphoestérases (ROCHE et BULLINGER [88], ROCHE, NGUYEN-VAN THOI et BAUDOIN (sous presse). Le tissu nerveux contiendrait un enzyme agissant spécifiquement sur les acides inosique et adénylique (REIS [81]). Si la plus grande partie des tissus de mammifères renferme des phosphatases, par contre, quelques uns n'en contiennent pas.

Mac FARLANE, PATTERSON et ROBISON [67] n'ont rencontré de phosphatases dans l'aorte que chez le Rat. MORII et TAKABATAKE [71] n'ont pu en trouver, dans les glandes lymphatiques humaines normales ; ROBISON, POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCOMONT [77] relatent son absence dans les cartilages hyalins. Selon PELUZZO [75] la phosphatase est pratiquement absente de la peau du Chien ; par contre, CEDRANGOLO [23] a mis en évidence la présence d'un enzyme hy-

drolysant les glycérophosphates dans les tissus sous-cutanés de ce même animal, et SAVIANO [92] a constaté l'existence dans le tissu adipeux du Chien d'une phosphatase dédoublant l'hexosediphosphate au même pH optimum que les glycérophosphates (9.0).

La répartition quantitative de la phosphatase de pH optimum 9,0 est très inégale dans les tissus d'un même organe. Tel est le cas du rein dans lequel la partie corticale possède la plus grande partie de cet enzyme [53-99]. Il en est de même pour les différentes régions de l'intestin : chez le Lapin, et le Chat, la partie la plus active est le jéjunum, l'iléon chez l'Homme [KAY 54] et le duodénum chez le Rat [52].

Une inégale répartition se rencontre dans les différentes parties des os (fémur) (Mac FARLANE, PATTERSON et ROBISON [67]). ROBISON et ses collaborateurs [82] étudièrent la localisation de la phosphatase dans les diverses zones des os ; ils ont montré que les parties d'un os, où l'ossification s'opère très rapidement (cartilage de conjugaison) sont beaucoup plus riches en phosphatase, laquelle, serait sécrétée par les ostéoblastes (ROBISON et FELL). POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCOMONT [77] étudiant la répartition histologique de la phosphatase dans les os longs des enfants, en trouvèrent beaucoup dans les zones de calcification méthaphysaires, le cartilage hypertrophique, moins dans le tissu spongieux méthaphysaire, et pas du tout dans le cartilage hyalin. De même dans les cals (ROCHE et MARTIN-POGGI [90]).

En dehors des organes, les phosphatases sont aussi présentes dans les humeurs, les sécrétions, et les excréctions. Le sérum renferme en quantité appréciable une phosphatase de pH optimum 9,0, dont les variations pathologiques sont utiles à connaître en clinique. On rencontre également des phosphatases dans les globules rouges et blancs (ROCHE [83]).

Parmi les sécrétions riches en phosphatases citons : la bile [100], le suc pancréatique [100], le suc intestinal [66], le lait [30-42], la salive [41] et le liquide séminal (KUTSCHER [64]). La phosphatase est aussi présente dans l'urine humaine où elle est sans doute d'origine à la fois prostatique et rénale [30-55-32] ; toutefois, HORII et TOMIKAWA [45] n'en purent trouver dans l'urine du Lapin. Les matières fécales en renferment des quantités considérables d'origine intestinale et bactérienne [43]. D'après UZAWA [102] il existe dans le venin d'un serpent (*Trimeresurus flaviridis*), une

phosphodiesterase capable de libérer le phénol du diphénylphosphate, sans agir sur le monophénylphosphate. Ce fait a été vérifié par GULLAND, qui a montré l'existence d'un enzyme hydrolysant les diesters dans les venins de nombreux vipéridés. IMAGAWA [47] signale l'existence dans les crachats tuberculeux d'une pyrophosphatase qui peut provenir des globules blancs ou des bacilles de KOCH.

II. — DIVERSITÉ DES PHOSPHATASES. CLASSIFICATION DE FOLLEY ET KAY.

A. — Classification.

La spécificité des phosphatases sur divers substrats a permis à FOLLEY et KAY [37] d'en établir une classification basée sur la nature des corps qu'elles hydrolysent. Ces enzymes ont été répartis en six groupes :

1° *Les phosphomonoestérases*, qui hydrolysent tous les monoesters de l'acide orthophosphorique.

2° *Les phosphodiesterases*, actives sur les diesters de l'acide orthophosphorique, mais n'attaquent qu'une seule liaison du diester.

3° *Les pyrophosphatases*, qui agissent sur les sels ou les diesters symétriques de l'acide pyrophosphorique.

4° *Les métaphosphatases*, hydrolysent les sels de l'acide métaphosphorique.

5° *Les phosphoamidases*, dédoublent les acides amidophosphoriques substitués à l'azote.

6° Enfin le dernier groupe est celui des phosphatases spécifiques d'un seul substrat, n'entrant pas dans les catégories précédentes. Il comprend :

la lécithinase,

la phytase,

l'adénylpyrophosphatase,

l'hexosediphosphatase.

L'existence de ces phosphatases en tant qu'enzymes actifs rigoureusement sur un seul ester ne peut actuellement être admise sans réserves.

Les phosphomonoestérases sont à la fois les plus importantes et les plus répandues des phosphatases ; aussi leur étude a-t-elle suscité le plus grand nombre de travaux rela-

tifs à celles-ci. Se basant sur leur pH optimum (3,0-5,6-9,0) MUNEMURA a tout d'abord distingué trois types de phosphomonoestérases. Par la suite, FOLLEY et KAY ont été amenés à en dissocier quatre, différant dans un ou plusieurs des trois caractères choisis comme critères d'individualité : le pH optimum d'action, le pouvoir hydrolytique préférentiel vis-à-vis de l' α - ou du β -glycérophosphate de sodium et l'effet inhibiteur ou activateur de l'ion magnésium.

La phosphomonoestérase A₁, de pH optimum 9,0, hydrolyse, plus activement le β - que l' α -glycérophosphate de sodium et Mg^{++} renforce son action. On la rencontre dans les os, le foie, le rein, le cerveau, les globules blancs et rouges du sang, le sérum, l'intestin. C'est la plus commune des phosphatases animales (ROBISON, et KAY).

La phosphomonoestérase A₂, de pH optimum 5,2-5,4, est insensible à Mg^{++} et dédouble préférentiellement le β glycérophosphate de sodium. Elle est présente dans le foie (BAMANN), le cerveau (CEDRANGOLO), la prostate (KUTSCHER) et dans de nombreux tissus végétaux, en particulier chez les champignons (NGUYEN-VAN THOAI).

La phosphomonoestérase A₃, de pH optimum, 3,0-4,0 est inhibée par Mg^{++} et son action sur les glycérophosphates varie suivant son origine, l'enzyme étant en général plus actif sur l'isomère α . On la rencontre dans la takadiastase, le son de riz (AZAKAWA), les champignons (NGUYEN-VAN THOAI), les organes animaux (BAMANN [10]).

La phosphomonoestérase A₄, de pH optimum 6,0, est le moins répandu des enzymes de ce groupe. Activé par les ions magnésium, il est beaucoup plus actif sur l' α - que sur le β -glycérophosphate de sodium. C'est l'une des phosphatases des hématies (ROCHE [83]) des levures basses (SCHÄFFNER et BAUER [93]).

La classification de FOLLEY et KAY ne saurait être considérée que comme approchée, car il est parfois difficile d'y faire entrer une action phosphatasique exercée par un extrait d'organe, les trois caractères de chaque type (A₁, A₂, A₃, et A₄) ne se trouvant pas toujours réunis selon l'une des modalités prévues. Elle est néanmoins la seule qui ait permis jusqu'ici une coordination assez étendue des observations faites dans les tissus animaux ou végétaux.

En ce qui concerne les pyrophosphatases, on n'a pu en donner qu'une classification sommaire, ces enzymes n'étant

différenciés que par leur pH optimum d'action. Selon TAKAHASHI, MUNEMURA, il existerait trois pyrophosphatases de pH optimum respectifs, 4,0-5,5 et 8,0. La dernière est la plus répandue dans les organes animaux (KAY), où sa répartition est parallèle à celle de la monoestérase. On verra plus bas comment ces enzymes peuvent être séparés les uns des autres.

B. — Facteurs modifiant l'activité phosphatasique.

Les plus importants de ceux-ci sont : la température, l'ion H^+ , les activateurs et les inhibiteurs spécifiques. Examinons successivement leurs effets.

1. TEMPÉRATURE. — Un substrat soumis à l'action hydrolysante d'un enzyme, à un pH déterminé, et à des températures variables, présente un optimum pour une certaine température, spécifique de l'enzyme. La température optima de la phosphatase A_1 du rein est par exemple de $42^{\circ},5$ [101]. Il ne faut pas atteindre dans les expériences de cet ordre une température trop élevée, car on provoquerait alors une inhibition due à la dénaturation du support protéique de l'enzyme.

2. ION H^+ . — Les pH optima d'action des quatre phosphomonoestérases sont différents ; par contre, les courbes de stabilité de ces enzymes en fonction du pH sont sensiblement voisines ; elles traduisent l'identité de sensibilité de leurs constituants protéiques à la dénaturation par les acides ou les bases. L'inactivation a lieu pour des pH soit inférieurs à 5,0, soit supérieurs à 7,0 ; entre ces deux limites elle est nulle ou minime.

La stabilité de la phosphatase rénale A_1 a été très étudiée. Elle est maxima entre $pH = 7,0$ et $8,0$ pour KING [58] et $6,5-8,2$ selon JACOBSEN [49]. Ce maximum migre vers $pH = 5$ pour la phosphatase A_1 des glandes mammaires (FOLLEY et KAY). D'après BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [13], une légère acidité du milieu inactive la phosphatase A_1 du foie, du rein et de l'os.

KOBAYASHI [61-62] et INOUE [48] soumettant la takadiasylase à une purification par adsorption, trouvent pour cet enzyme un pH optimum voisin de 3 alors que les préparations non purifiées ont un pH optimum proche de 5,5, en

raison de la présence d'une substance dialysable stable à l'ébullition (substance X), qui altère la constante de dissociation basique de l'enzyme ampholyte dont les molécules neutres sont actives. Ceci permettra-t-il une explication de l'activation des enzymes par l'ion H^+ ?

Des différences de sensibilité aux ions H^+ et OH^- permettent d'inactiver sélectivement une phosphatase en respectant d'autres coexistant dans le même tissu. BAMANN et DIEDRICH [5] ont montré que l'acide acétique inactive A_1 préférentiellement à A_2 et A_3 , et qu'inversement, l'ammoniaque inactive plus vite A_2 et A_3 qu' A_1 [6].

3. ACTIVATEURS SPÉCIFIQUES. — a) *Ion Mg^{++}* — L'ion Mg^{++} a sur la phosphomonoestérase A_1 , une action activatrice découverte par ERDTMAN en 1927 [34] et étudiée par KAY en 1932 [52], puis par JENNER et KAY [51]. D'après BAMANN, RIEDEL et DIEDERICH [9], les desmoenzymes, sont moins sensibles à l'action de Mg^{++} que les lyoenzymes. Cette activation paraît être en raison inverse de la complexité du support colloïdal de l'enzyme. Le mécanisme de l'action de Mg^{++} a été interprété de façons différentes : le magnésium se combinerait au substrat S sous la forme S-Mg, moins sensible à l'action inhibitrice de l'ion $PO_4^{=}$, (BAMANN et RIEDEL [8], BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [14]). Une autre interprétation est la formation d'une combinaison : Enzyme — Mg — Substrat, seule susceptible de permettre le dédoublement du substrat (BAUER [12]).

Mg^{++} n'agit pas de façon identique sur les diverses phospho-estérases. Comme nous venons de le voir, la phosphatase A_1 de l'os, du rein, et de nombreux tissus animaux, est activée par l'ion Mg^{++} au pH optimum d'action 9,0 (ERDTMANN [34-35]). JENNER et KAY [51] ont établi qu'il existe une concentration optima (soit M/1.000 à M/500) en sels de magnésium provoquant l'activation ; une concentration supérieure est inhibitrice. La phosphatase A_2 du foie, de la rate, du rein (BAMANN et RIEDEL [8]) est insensible à la présence de l'ion Mg^{++} . Celui-ci inhibe légèrement l'action de la phosphatase A_3 du rein (MUNEMURA) et de la takadiastase sur l'acide β -glycérophosphorique, alors qu'il augmenterait le pouvoir hydrolytique de ce même enzyme vis-à-vis de son isomère α (AKAMATSU). En fait, il semble bien que toutes les phosphatases A_3 soient inhibées par Mg^{++} (NGUYEN-VAN THOAI ; ROCHE et NGUYEN-VAN

THOAI). L'enzyme A_4 de la levure n'agit qu'en présence de sels de magnésium (SCHÄFFNER et BAUER [93]) ; quant à celle des hématies de pH optimum 6,0, elle est peu sensible à l'action des ions Mg^{++} dans les hémolysats, mais activée par ceux-ci quand elle a été purifiée par adsorption sur kaolin (ROCHE et BULLINGER [88]). Toutes les pyrophosphatases paraissent activées par Mg^{++} (ASAKAWA, HORII, KOBAYASHI). Un travail récent de ROCHE et NGUYEN-VAN THOAI (sous presse au *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, 1942, N° 3) apporte une étude d'ensemble sur le mécanisme d'action de Mg^{++} . Celle-ci se manifeste dans tous les cas par une sorte de « neutralisation » de l'action inhibitrice des ions PO_4^- libérés par l'hydrolyse du substrat et par une modification directe de l'affinité de l'enzyme pour le substrat, due sans doute à la formation d'une combinaison : enzyme-Mg. Dans le cas de la phosphatase A_1 , Mg^{++} augmente l'affinité de l'enzyme (intestin) pour le substrat, tandis qu'il la diminue dans le cas de la phosphatase A_3 (champignons). Les sels de magnésium activent faiblement les diverses pyrophosphatases (KURATA, TAKAHASHI).

b) *Autres activateurs.* — Les seuls corps, en dehors des sels de magnésium, dont les effets activateurs paraissent certains sont les acides aminés et certains ions métalliques, entre autres Mn^{++} et Zn^{++} (BODANSKY [16-17] ; TANNHÄUSER, REICHEL, GRATAN et MADDOCK [98]). Les acides aminés tels que le glycocolle, l'alanine (*) activent la phosphatase A_1 du rein, de l'intestin, cette action étant renforcée par la présence d'ions Zn^{++} (ELVEHJEM, HOVE et HART [46]). L'action de Mn^{++} est mise en doute par ALBERS, mais considérée comme certaine par CLOETENS ; elle ne s'exercerait que sur l'enzyme A_1 .

4. INHIBITEURS SPÉCIFIQUES. — Le produit de l'hydrolyse des esters : phosphates et glycérol ralentissent l'activité des phosphoestérases, les phosphates exerçant à cet égard une action beaucoup plus marquée que les alcools (KAY [54] ; ROCHE [83] ; WESTENBRINK [106] ; MUNEMURA [72]). L'inhibition par les phosphates a été observée sur les quatre types d'estérase. De même l'inhibition par les arsénates [34-35-60-76], l'une et l'autre étant fortement diminuées par Mg^{++} (ROCHE et NGUYEN-VAN THOAI). La phosphatase A_1 serait inhibée par les thiols (PYLE [78] ; WILLIAMS et WATSON ; ALBERS ;

(*) Mais non la tyrosine et les acides aminés cycliques.

WALDSCHMIDT-LEITZ), mais ce fait a été mis en doute par LOHMANN, KÖSTER et BERSIN. La phosphatase A_4 serait inhibée par les mêmes corps (SCHÄFFNER et BAUER), auxquels la phosphatase A_2 est insensible (PFANDKUCH, ALBERS). L'effet de l'acide ascorbique sur la phosphatase alcaline apparaît comme encore plus incertain. Ce corps serait activateur pour TANNHÄUSER, REICHEL, GRATTAN et MADDOCK [98], indifférent pour KING et DELORY [59 bis], pour ALBERS [1] et inhibiteur pour VON EULER. Il est inhibiteur de l'enzyme A_2 (GIRI, COURTOIS, PFANDKUCH).

Les fluorures inhibent en général faiblement les phosphatases A_1 (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [15] ; INOUE [48] ; KAY [54]), A_2 , A_3 [72] et A_4 [88]. Les phosphatases inhibées par NaF paraissent être réactivées partiellement grâce à la dialyse des fluorures [15]. L'action des fluorures sur l'enzyme A_1 est contestée par de nombreux auteurs en ce qui concerne la phosphatase rénale. Il est certain que les phosphatases à pH optimum acide y sont plus sensibles que celles à pH optimum alcalin. Les oxalates inhibent la phosphatase A_1 [15] ; de même l'acide cholique [97] et KCN [11]. Toutefois, l'activité de ces corps est plus ou moins nette suivant l'origine de l'enzyme. Enfin, le phlorhidzosite et le salipurposide, comme d'autres glucosides voisins gênent l'action de la phosphatase A_1 (RABATÉ et COURTOIS [79]), ce qui jouerait un certain rôle dans l'action du phlorhidzosite sur le métabolisme glucidique d'après LUNDSGAARD (diabète phlorhidzinique).

5. ACTION SUR LES α - ET β GLYCÉROPHOSPHATES DE SODIUM. —

Les phosphatases peuvent encore se différencier par leur aptitude à hydrolyser plus rapidement une des formes α ou β du glycérophosphate de sodium. L'isomère β est dédoublé préférentiellement à l' α par les phosphatases : A_1 du rein (KAY [53]), des leucocytes et du sérum (ROCHE [83], ROCHE et LATREILLE [84]), de l'intestin [83], de la rate (DAVIES [28]) ; A_2 de la rate [28], du son de riz, du foie, du pancréas, du rein (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [15] ; BAMANN et RIEDEL [8]) ; A_3 de la takadiastase (ASAKAWA [2]). Parmi celles hydrolysant plus rapidement l'isomère α notons surtout A_4 des hématies anuclées [83] ou nucléées (ROCHE et LATREILLE [84]) et des levures basses (SCHÄFFNER et BAUER [93]). Toutefois ce caractère n'est pas absolu et il a été possible de modifier expérimentalement l'affinité d'une phosphatase pour l'un ou l'autre isomère (ROCHE et LATREILLE, BAMANN).

III. — LE SYSTÈME PHOSPHATASIQUE DE L'INTESTIN.

Le système phosphatasique de divers organes, entre autres, le foie (BAMANN et DIEDERICHs), l'os (ROBISON), le rein (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI ; ALBERS et ALBERS), la glande mammaire (KAY), ont été particulièrement étudiés et l'on a pu mettre en évidence des particularités de certains de ses constituants dans l'un ou l'autre organe. On n'a pas consacré, à notre connaissance, de travail d'ensemble au système phosphatasique de l'intestin et le principal objet de notre travail est de combler cette lacune. C'est pourquoi nous examinerons en détail les recherches antérieures au cours desquelles des données ont été obtenues sur les phosphatases intestinales.

Comme il est bien établi que les principales de celles-ci, sinon les seules, sont une phosphomonoestérase et une pyrophosphatase de pH optimum d'action alcalin (KAY, ROCHE), nous passerons en revue diverses propriétés de ces enzymes, dont la connaissance est indispensable à l'étude du système phosphatasique de l'intestin. Par ailleurs, comme il n'a pas été jusqu'ici préparé de phosphatase intestinale purifiée, il nous a paru utile d'exposer les principaux travaux sur la purification des enzymes d'autres origines afin de nous y référer ultérieurement pour aborder la purification de ceux de l'intestin.

A. — Existence d'un système phosphatasique dans la muqueuse intestinale.

La muqueuse intestinale est la source la plus riche en *phosphomonoestérase* A_1 de pH optimum d'action 9,0-9,2, activée par les sels dissociables de magnésium et hydrolysant préférentiellement le β -glycérophosphate de sodium. KAY [54], comparant les activités relatives de la phosphatase dans les diverses portions de l'intestin de plusieurs espèces de mammifères, a conclu que la portion la plus riche est le jéjunum et l'iléon chez l'Homme, le duodénum chez le Rat. Une *pyrophosphatase*, a été mise en évidence dans cet organe par le même auteur [56]. A côté de ces deux enzymes HEYMANN [43] signale dans le système intestinal la présence d'une *hexosediphosphatase* spécifique, distincte de la phosphatase alcaline, abondante dans la partie supérieure de l'intestin grêle, et en

plus petite quantité dans l'iléon et le rectum. Les recherches d'HEYMANN méritent d'être reprises, car l'existence d'une hexosediphosphatase spécifique ne peut être, encore considérée comme certaine. LEVENE et DILLON [66], DEUTSCH et RÖSLER [31] trouvèrent dans la muqueuse intestinale une *nucléotidase* libérant du phosphate inorganique à partir des nucléotides. Ne serait-elle pas identique à la phosphomonoestérase de laquelle elle est toujours accompagnée. Les faits qui plaident en ce sens sont les suivants : son activité est liée à la concentration de phosphomonoestérase A_1 . Elle est rendue inactive par les mêmes agents que l'estérase. La nucléotidase pure hydrolyse les esters phosphoriques à $pH = 9,0$ et inversement, la phosphomonoestérase pure agit sur les nucléotides. Enfin, Mg^{++} a sur ces deux enzymes une action identique. De plus, TAKAHASHI [95], couplant l'action phosphodiéstérasique du venin de serpents, et phosphomonoestérasique de l'intestin de Porc arrive à produire une rapide déphosphorylation de l'acide nucléique des levures. La signification de ces recherches en ce qui concerne la présence de liaisons du type diester phosphorique dans les acides nucléiques demeure obscure, car, comme l'ont montré KLEIN et ROSSI, les venins employés renferment toujours un mélange de mono- et de diestérase. Ces divers travaux tendant à démontrer l'existence d'une nucléotidase distincte de la phosphoestérase mériteraient d'être confirmés.

CLOETENS [24] à la suite des recherches de BODANSKY [18] signalant que les acides biliaires à la concentration de 0,00625 M inhibent les phosphatases des os et du rein, mais sont sans effet sur la phosphatase intestinale, s'efforce d'identifier deux phosphatases alcalines dans les divers organes animaux. Alors que BODANSKY conclut à la différenciation des phosphatases de l'os et du rein d'une part, de l'intestin d'autre part, CLOETENS envisage l'existence dans les divers tissus de deux phosphatases isodynamos, actives toutes deux au pH optimum de 9,0 et présentes en proportions très variables suivant les organes. Ces deux enzymes n'ayant pas les mêmes propriétés, il en résulterait les dissemblances dans les divers systèmes enzymatiques à optimum alcalin notées par de nombreux auteurs. Les conclusions de CLOETENS sont basées sur le comportement des phosphatases des divers organes (intestin, rein, poumons, os, foie) à l'égard de KCN et de SO_4Mg à diverses concentrations.

L'action, soit de Mg^{++} à la concentration de $SO_4Mg\ 10^{-2}\ M$, soit de $KCN\ 10^{-2}\ M$ en présence de $SO_4\ Mg\ 10^{-2}\ M$ conduit à des résultats divers suivant le tissu traité : $KCN\ 10^{-2}\ M$ en présence de $SO_4Mg\ 10^{-2}\ M$ inhibe très fortement les phosphatases de l'intestin, du sérum, des os, et du poumon (90 à 100 p. 100), moins fortement celle du rein (66 à 80 p. 100), et très peu celle du foie (10 à 30 p. 100).

Quant à l'activation par $SO_4Mg\ 10^{-2}\ M$ sur ces organes elle varie en sens inverse. Il a été possible à CLOETENS d'obtenir à partir de la muqueuse intestinale une phosphatase alcaline présentant en présence de $KCN + SO_4Mg$ une inhibition de 100 p. 100, et dont l'activation par $SO_4Mg\ 10^{-2}\ M$ était variable et par ailleurs, un extrait de poudre de foie traité par l'acétone et séché libère une phosphatase dépourvue d'activité en l'absence de SO_4Mg et très faiblement inhibée (6 p. 100) par $KCN\ 10^{-2}\ M$ en présence de SO_4Mg .

CLOETENS appelle : phosphatase I celle inactive en l'absence de Mg^{++} , et non influencée par KCN en présence de Mg^{++} ; et phosphatase II celle fortement inhibée par KCN et influencée d'une manière variable par Mg^{++} . Le rapport de I à II va en décroissant dans l'ordre : foie > rein > poumons > os > intestin. Ces expériences ont été faites sur des extraits d'organes non purifiés ainsi que sur les précipités obtenus au cours de la dialyse, ce qui aurait permis d'isoler ces deux phosphatases. L'intestin serait particulièrement riche en phosphatase II, alors que le foie posséderait surtout la phosphatase I. Ces différences proviennent-elles d'impuretés ? Non, d'après CLOETENS, car ces impuretés seraient non dialysables, et liées de telle manière aux enzymes, que dans un mélange les phosphatases conservent leurs propriétés originelles. De toute manière, les expériences n'emportent pas la conviction et il est souhaitable de les reprendre sur des préparations purifiées.

En dehors de son action phosphomonoestérasique, de pH optimum 9,0 l'intestin hydrolyse les pyrophosphates et les diestersphosphoriques au pH optimum 8 environ. Il contient donc une pyrophosphatase et une phosphodiesterase (KAY, ROCHE, NEUBERG et WAGNER). L'activité relative des extraits de muqueuse intestinale (au pH optimum) sur un ensemble de substrats (sels de sodium) a été étudiée par ROCHE, auquel nous empruntons les résultats suivants : α -glycérophosphate, 38,4 ; β -glycérophosphate, 44,4 ; glucosemonophosphate, 37,9 ;

fructosemonophosphate, 48,4 ; fructosediphosphate, 47,4 ; monoéthylphosphate, 21,3 ; diéthylphosphate, 0,2 ; monophénylphosphate, 48,4 ; adénylate, 14,0 ; guanylate, 15,2 ; tréhalosemonophosphate, 6,1 ; diphosphoglycérate, 9,1 ; Pyrophosphate 35,2.

Comme on le voit l'action phosphomonoestérasique s'exerce fortement sur un assez grand nombre de substrats, l'action pyrophosphatasique est forte, tandis que le pouvoir phosphodiéstérasique est faible dans les extraits de muqueuse intestinale.

B. — Etude de la phosphomonoestérase et de la pyrophosphatase intestinales.

Les seuls enzymes de la muqueuse intestinale identifiés avec certitude sont : la phosphomonoestérase A_1 et la pyrophosphatase. C'est d'elles seules que nous nous occuperons dans le paragraphe (*). Avant de résumer les recherches relatives à ces deux enzymes, nous allons examiner les travaux antérieurs faits sur l'ensemble des systèmes estérasique A_1 et pyrophosphatasique alcalin.

1. SYSTÈME ESTÉRASIQUE. — La phosphomonoestérase A_1 , de type alcalin, hydrolyse tous les monoesters phosphoriques à l'exception de ceux des alcools hydroaromatiques ou secondaires [83-39]. Un des *grands problèmes relatifs à cette monoestérase est celui de son unité*. Entre autres sujets, on a cherché à savoir si la phosphatase, déphosphorylant les nucléotides est ou non identique à la phosphatase de type alcalin active sur les autres esters. Ce problème, déjà discuté plus haut, pose la question de la spécificité des phosphoestérases. La seule manière de le résoudre avec certitude est de purifier et de fractionner les enzymes.

a) *Purification*. — L'extraction de l'enzyme des tissus n'est jamais quantitative, une fraction de ce corps restant en partie fixée aux cellules (desmoenzymes). Une autolyse préalable en présence d'antiseptiques est nécessaire pour en extraire les phosphatases. Les essais de purification sont basés sur deux principes : éliminer les impuretés du milieu naturel et extraire isolément l'enzyme de ce milieu (adsorption ou précipitation spécifiques).

(*) La phosphodiéstérase de la muqueuse intestinale signalée par NEUBERG et WAGNER, par ROCHE n'a fait l'objet d'aucun travail.

La plupart des impuretés sont constituées par des protéines. C'est à leur élimination que l'on s'est attaché, mais on se heurte ici à un inconvénient : les phosphatases se trouvent adsorbées par les protéines au cours de leur précipitation. Divers auteurs (MARTLAND et ROBISON [69]) ont obtenu une poudre riche en estérase A_1 à partir d'extraits aqueux d'os précipités à l'aide de mélanges dalcool et d'éther. Cette préparation sèche, mise à macérer dans de l'eau, libère l'enzyme dépouillé de ses impuretés protéiques.

Les méthodes de purification les plus satisfaisantes sont celles exposées par WILLSTÄTTER, reposant sur l'adsorption spécifique soit des impuretés ou des enzymes et l'élution de ceux-ci, toutes ces opérations devant être réglées à un pH bien défini (existence d'un pH optimum d'adsorption et d'élution). EHRENSVAARD [33] adsorbe les impuretés accompagnant la phosphatase A_1 rénale par l'acide stéarique, en ayant au préalable libéré l'enzyme par digestion trypsique. Il est beaucoup plus facile d'adsorber l'enzyme, soit sur du kaolin, soit sur de l'alumine. TAKAHASHI [96] affirme avoir séparé la phosphomonoestérase A_1 du rein, de la pyrophosphatase par adsorption de cette dernière sur du $Fe(OH)_3$. ALBERS et ALBERS [1 bis] ont obtenu à partir de reins un autolysat riche en phosphatase et très pauvre en protéines en opérant l'autolyse du rein en présence d'acétate d'éthyle et de toluène. L'addition d'alcool à ce milieu précipite la presque totalité de l'enzyme, ainsi que des protéines, mais celles-ci, dénaturées par l'alcool resteront ultérieurement insolubles dans l'eau alors que la phosphatase passera en solution.

La purification par adsorption et élution a été largement employée par l'école japonaise (AKAMATSU, HORII, KOBAYASHI, TAKAHASHI) et par ROCHE et ses collaborateurs. C'est ainsi que, par exemple, on sépare dans les hématies l'enzyme A_1 des autres phosphatases par adsorption sur kaolin à pH = 5 et élution par NH_3 à pH = 9.

Il n'existe pas de travail sur la purification des phosphomono- et -diestérases intestinales.

b) *Spécificité de la phosphomonoestérase A_1 .* — ROCHE et LATREILLE [86], partant d'un extrait de rein préparé selon ALBERS, arrivent par adsorption sur kaolin, à obtenir une préparation riche en phosphomonoestérase, et entièrement dépourvue de diestérase ; ce qui leur permet d'affirmer l'exis-

tence de monoestérases et diestérases spécifiques. Ce résultat a permis aux mêmes auteurs [87] d'aborder le problème de la spécificité de la phosphomonoestérase A_1 et celui de son unité.

Leurs travaux ont eu pour but de rechercher si des autolysats obtenus dans diverses conditions hydrolysent toujours dans le même rapport divers esters phényles ou éthyles de l'acide phosphorique, et les α - ou β -glycérophosphates de sodium. Ces auteurs ont pu dissocier à partir d'une préparation de rein purifiée, les actions respectives de la phosphomonoestérase A_1 sur les acides monophénylphosphoriques, α - et β -glycérophosphoriques ; ils concluent à la vraisemblance d'un mélange d'enzymes spécifiques d'un monoester, ou d'un groupe de ceux-ci dans la phosphomonoestérase A_1 . Il est également possible qu'il n'existe qu'une seule phosphatase contenant de nombreux groupements fonctionnels spécifiques de la combinaison de l'enzyme à un seul substrat.

c) *Activateurs*. — Nous avons déjà relaté le mécanisme de l'activation par Mg^{++} , sans nous étendre sur l'action de celui-ci sur les phosphatases A_1 des différents organes.

L'action activatrice de Mg^{++} (ERDTMANN) se manifesterait sur l'enzyme A_1 de l'os (ROBISON et KAY ; ROSSI [91] ; ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [89]) ; cependant pour ces derniers auteurs l'enzyme de l'os n'est fortement activable par Mg^{++} que lorsque les os ont dépassé les premières étapes de leur croissance. Pour BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI, l'ion magnésium est sans action sur l'enzyme osseux. Mg^{++} active la phosphatase A_1 de la rate (DAVIES [28]), du cerveau (CEDRANGOLO [22-23]), du rein, de la glande mammaire (FOLLEY et KAY [38]) ; du lait (CONTARDI [26]) ; de la salive (GIRI [41]) ; des dents (MACKENZIE [68]) ; des hématies (ROCHE et BULLINGER [88]) ; du foie (BAMANN et DIEDERICH [6]). Une macération intestinale purifiée additionnée de Mg^{++} , présente une courbe de vitesse de réaction linéaire, alors qu'en son absence la vitesse tend à décroître rapidement (HOLMBERG [44]). CATTANEO [21] signale que l'action activatrice de Mg^{++} est faible pour une forte concentration en enzyme et au voisinage de l'équilibre. Fe^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , favorisent l'action de la phosphatase hépatique (BAMANN et HEUMÜLLER [7]) ; et plasmatique (TANNHÄUSER et collaborateurs [98]) ; bien que les effets de Mn^{++} n'aient pas pu toujours être retrouvés,

CLOETENS les considère comme absolument caractéristiques de la phosphatase A_1 . L'action de Zn^{++} (HOVE et collaborateurs) est plus complexe. Cet ion ne semble, en effet être activateur qu'en présence d'acides aminés, dont il renforce les effets.

BODANSKY [17] a étudié l'action de Mg^{++} , et d'acides aminés (glycocolle, alanine) sur l'activité des phosphatases rénales et intestinales. Les acides aminés à faible concentration (0,0001 M à 0,01 M) augmentent l'activité de la phosphatase A_1 . De plus fortes doses ont un effet inhibiteur. Mg^{++} active la phosphatase A_1 rénale et intestinale purifiée, et la glycine prévient le ralentissement de la vitesse de la réaction au cours de l'hydrolyse du substrat. Une dialyse trop prolongée provoque une inhibition, qui serait due à l'élimination complète du magnésium et des acides aminés contenus normalement dans les extraits rénaux et intestinaux, ainsi qu'à une inactivation de l'enzyme. Des faits du même ordre ont été récemment signalés par HOVE et ELVEHJEM et HART [46], pour lesquels l'action activatrice des acides aminés sur la phosphatase intestinale du Rat serait couplée avec celle d'ions zinc. Toutefois, l'interprétation de l'inhibition de la phosphatase A_1 par dialyse doit être réservée, car de récents travaux D'ALBERS, reprenant des essais poursuivis en 1936, semblent indiquer que l'enzyme est susceptible au cours d'une dialyse prolongée de se scinder en coenzyme dialysable et en apoenzyme colloïdal.

d) *Inhibiteurs*. — Les principaux d'entre eux sont les phosphates, dont le mécanisme d'action est probablement analogue à celui des arsénates. Les acides taurocholique, glycocholique, désoxycholique, et déhydrocholique diminuent considérablement l'activité des phosphatases osseuse et rénale, sans toucher à la phosphatase intestinale [18]. La phosphatase A_1 est en général inhibée par le fluorure de sodium (KAY [54]). L'oxalate inhibe les phosphatases alcalines par formation du complexe : Enzyme — oxalate inactif ; l'addition de phosphates inorganiques empêcherait la formation de ce composé (BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [14]). Quant à l'action des thiols, (cystéine, glutathion) et de l'acide ascorbique, elle a été examinée plus haut. Rappelons seulement que les thiols, tenus pour inhibiteurs par PYLE, WILLIAMS et WATSON, ALBERS, WALDSCHMIDT-LEITZ, seraient sans effet pour KÖSTER et BERSIN, pour LOHMANN. Quant

à l'acide ascorbique il est activateur pour certains, inefficace pour d'autres et inhibiteur pour quelques uns

2. SYSTÈME PYROPHOSPHATASIQUE. — Des extraits de foie, de rein, de placenta, d'intestin, sont capables de dédoubler les esters de l'acide pyrophosphorique, en acide orthophosphorique et l'on a pensé qu'il existait une ou plusieurs pyrophosphatases spécifiques (KAY [56]) dans ces organes. La répartition de cet enzyme est à peu près semblable à celle des monoestérases mais le pH optimum d'action de celle qui est la plus active dans les tissus animaux est inférieur à celui de la phosphomonoestérase ; il est compris entre 7,2 et 7,8.

Selon KURATA [63] l'action des pyrophosphatases exige des activateurs. La pyrophosphatase de la takadiastase ne peut, d'après lui, hydrolyser le diphénylpyrophosphate qu'en présence d'un activateur rénal inconnu. TAKAHASHI [96] pense avoir prouvé l'existence dans le tissu rénal d'au moins deux types de pyrophosphatases qui, en présence de leurs activateurs hydrolysent le diphénylpyrophosphate aux pH optima respectifs de 4 et 9. Il admet en outre l'existence d'un troisième type à optimum d'action aux environs de 5,5 dans le son de riz (UZAWA). MUNEMURA [72] affirme avoir préparé et séparé ces trois types, dont ceux à pH optimum 4 et 5 existent dans le rein. NGUYEN-VAN THOAI a retrouvé les deux à optimum acide dans les champignons. Enfin, FLEURY et COURTOIS [36] étudiant comparativement la cinétique des actions pyro- et glycérophosphatasiques de l'extrait d'amandes douces à pH = 5,2 concluent à l'existence d'une pyrophosphatase et d'une estérase spécifiques ayant l'une et l'autre ce pH optimum. JACOBSEN [50] a mis en évidence dans le foie une pyrophosphatase spécifique de l'adénylpyrophosphate. Ce fait a été confirmé par BARRENSCHEEN et LANG [11]. L'enzyme isolé est sans action sur le glycérophosphate et les pyrophosphates minéraux, mais décompose l'acide adénylpyrophosphorique en acide adénylique et orthophosphorique. On suppose que cet enzyme diffère de la phosphomonoestérase A_1 par le fait qu'il serait inhibé par Mg^{++} et sa répartition dans les différents tissus ne serait pas semblable à celle de l'estérase A_1 . SATOH [91 bis] pense que l'action combinée de la phosphomonoestérase et pyrophosphatase est indispensable pour assurer la complète déphosphorylation de

l'acide adénylpyrophosphorique et qu'il n'existe pas d'adénylpyrophosphatase. L'action des phosphatases de l'intestin sur l'acide adénylpyrophosphorique n'a pas été étudiée à notre connaissance.

a) *Essais de purification.* — Les pyrophosphatases ont, de même que les monoestérases fait l'objet de quelques essais de purification. KURATA [63] sépare la pyrophosphatase alcaline de la monoestérase du rein ainsi : il traite l'autolysat de rein, de réaction légèrement alcaline par $Mg(OH)_2$. Le liquide résiduel hydrolyserait l'acide pyrophosphorique à pH 3,5, sans toucher au phénylphosphate, et au diphénylpyrophosphate. Il resterait une légère activité résiduelle de la pyrophosphatase et de la monoestérase à optimum alcalin due à l'incomplète élimination de ces derniers enzymes au cours de la préparation. TAKAHASHI [96] essaie de séparer dans un autolysat de rein la pyrophosphatase à pH optimum = 8,6-8,9, des autres pyrophosphatases par adsorption sélective de la première sur du kaolin en milieu légèrement acidifié par PO_4NaH_2 , puis élution en présence de phosphate disodique. Une dialyse prolongée permet l'élimination de tout le phosphate. Cette préparation hydrolyse le pyrophosphate à pH = 8,6-8,9 sans attaquer le phénylphosphate ni le diphénylpyrophosphate. Ce dernier ester est cependant hydrolysé par la pyrophosphatase en présence de l'activateur de KURATA.

La pyrophosphatase découverte par TAKAHASHI dans le son de riz, à pH optimum voisin de 5, n'a pu être isolée des autres phosphatases. La séparation de l'adénylpyrophosphatase des autres enzymes a été effectuée par JACOBSEN [49]. Elle est basée sur l'inactivation sélective de ces derniers, éliminés en chauffant à 55° pendant six à sept minutes des extraits de foie légèrement acidifiés et enrichis en $CiNH_4$. L'adénylpyrophosphatase beaucoup plus thermostable demeure seule dans la préparation. Aucun essai de purification de l'enzyme intestinal n'a été tenté à notre connaissance.

b) *Activateurs.* — Quelques chercheurs ont examiné l'action de Mg^{++} et d'autres corps sur cette catégorie d'enzymes.

BAMANN [7] mentionne que la pyrophosphatase du foie de Porc (pH optimum = 4) est fortement activée par Mg^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , et très peu sensible à l'action du Mn^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} ; Celle du rein est fortement activée par $MgCl_2$ [4]. D'après BAUER

[12] le pyrophosphate n'est pas hydrolysé par la pyrophosphatase de la levure basse (pH optimum 6,5) en l'absence de Mg^{++} . Les pyrophosphatases acides sont faiblement activées par Mg^{++} (MUNEMURA, NGUYEN-VAN THOI). Quant à l'activateur spécifique inconnu de KURATA, il a déjà été signalé. Un seul travail d'ensemble du à MUNEMURA [72] a été consacré à l'étude comparée de divers activateurs et inhibiteurs sur les trois pyrophosphatases différant par leur pH optimum. Aucun de ces enzymes ne serait sensible à l'action de Mg^{++} ($MgCl_2$ M/500) ni de Ca^{++} ($CaCl_2$ M/500).

c) *Inhibiteurs*. — Selon MUNEMURA, les phosphates et les arsénates (M/500) sont inhibiteurs, fortement pour l'enzyme rénal de pH optimum alcalin, donc probablement aussi pour la pyrophosphatase intestinale signalée par KAV; en revanche, leur action inhibitrice est faible sur les pyrophosphatases acides. Le fluorure de sodium M/50 est sans action sur l'enzyme alcalin et inhibe fortement les pyrophosphatases acides (son de riz, rein). Le molybdate de sodium M/500 gêne notablement l'activité de ces dernières, mais non celle du premier, tandis que l'oxalate de sodium n'est inhibiteur que de la pyrophosphatase alcaline et de la plus acide. Il est à remarquer que le travail de MUNEMURA n'a porté que sur des macérations de rein ou de son et non sur des enzymes purifiés, en sorte que ses résultats peuvent tenir en partie à la présence de substances naturelles accompagnant les enzymes.

Pour BAUER [12] l'action inhibitrice de NaF sur la pyrophosphatase de pH optimum 6,5 (levure) peut être contrebalancée par l'addition de quantités croissantes de sels de magnésium. Selon le même auteur, $CaCl_2$ diminue l'activité de cette pyrophosphatase, mais la présence de Mg^{++} empêche cet effet de l'ion calcium.

De toute manière, si la pyrophosphatase alcaline semble présenter des caractères assez fixes, il ne semble pas en être de même des pyrophosphatases acides; celles-ci ont un pH optimum variable suivant leur origine (levures, champignons, organes animaux) et leur activation comme leur inhibition par divers agents diffère souvent selon les conditions d'étude adoptées par les auteurs.

IV. — OBJET DU TRAVAIL.

Le système phosphatasique du foie, du rein, du cerveau, des hématies, de la rate, de la glande mammaire a fait l'objet d'études systématiques, et il est surprenant qu'il n'en ait pas été de même de l'intestin, organe le plus riche en phosphomonoestérase A_1 et en pyrophosphatase à optimum alcalin (KAY). Nous nous sommes proposés de combler cette lacune.

Nos connaissances actuelles sur le système phosphatasique de la muqueuse intestinale peuvent être résumées ainsi : On rencontre dans ce tissu une phosphomonoestérase A_1 , une pyrophosphatase et une phosphodiesterase et il est par ailleurs possible qu'à celles-ci s'ajoutent des phosphatases spécifiques d'un groupe de substrats : nucléotidase, hexosediphosphatase, adénylpyrophosphatase. La phosphomonoestérase A_1 , de pH optimum 9,0 est activée par Mg^{++} et certains pensent qu'elle se distingue de celle des autres organes par son insensibilité aux acides biliaires. L'action de l'acide ascorbique et des thiols sur elle est incertaine. La phosphodiesterase n'a pas fait l'objet de recherches particulières ; de même, la pyrophosphatase de pH optimum voisin de 8.

Nous nous sommes proposés d'étudier :

1. *Les caractères du système phosphatasique de l'intestin dans des macérations de muqueuse brute ou dialysée ;*
2. *La purification et, si possible, la séparation des enzymes constituant ce système ;*
3. *Les caractères des enzymes intestinaux purifiés et particulièrement l'influence qu'exercent les oxydants et les réducteurs sur leur activité.*

En dehors de la définition des caractères des enzymes intestinaux, nous espérons tirer de cette étude des données permettant de préciser si ces phosphatases doivent ou non être considérées comme identiques à celles des autres organes animaux de même pH optimum d'action.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches personnelles sur le système phosphatasique de la muqueuse intestinale.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Les recherches que nous avons poursuivies depuis 1938 sur les phosphatases ont eu pour principaux objets la caractérisation, la purification et le mode d'action de ces enzymes (*). Nous présenterons les résultats de nos expériences sur le système phosphatasique intestinal en trois chapitres, à savoir :

1. Description générale du système phosphatasique de la muqueuse intestinale. Caractères des enzymes bruts.
 2. Essais de purification et de séparation des divers constituants enzymatiques du système.
 3. Caractères des enzymes purifiés.
-

(*) Nous remercions MM. les Professeurs F. MERCIER et J. MALMEJAC d'avoir bien voulu mettre à notre disposition pendant plusieurs années les organes des animaux sacrifiés dans leurs laboratoires.

CHAPITRE I.

DESCRIPTION GÉNÉRALE DU SYSTÈME PHOSPHATASI- QUE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE.

Toutes les expériences dont nous rapportons les résultats ont été répétées *plusieurs fois*, de manière à ce que les données obtenues présentent un caractère de précision permettant une interprétation sûre. C'est uniquement pour abrégé notre exposé que nous ne faisons état que d'un seul essai dans tous les cas étudiés, choisissant l'un des plus démonstratifs comme exemple.

A. — Matériel d'étude.

Toutes nos expériences ont porté sur des macérations de muqueuse intestinale de Chien. L'intestin est nettoyé aussitôt après le prélèvement par passage d'un courant d'eau, puis ouvert sur toute sa longueur. La muqueuse est séparée par raclage léger au scalpel, puis mise en suspension dans environ deux fois son poids d'eau distillée à laquelle on ajoute 2 à 4 p. 100 de chloroforme pour empêcher le développement des bactéries. Au bout de 48 heures à $+ 2^{\circ}$, la macération présente déjà une forte activité. Nous laissons généralement, l'autolyse se poursuivre pendant 8 jours, temps au bout duquel nous recueillons par centrifugation le liquide surnageant, dont l'activité phosphatasique n'est pas altérée par un long séjour à la glacière (plusieurs mois).

Les substrats employés sont : les α - et β -glycérophosphates de sodium purs préparés par M. O. BAILLY, que nous remercions de son obligeance, les méthyl- et éthylphosphates, hexosemono- et hexosediphosphates de sodium, les pyrophosphate et adénylpyrophosphate de sodium, ce dernier préparé à partir d'un échantillon de sel de baryum que nous avait remis M. le Professeur O. MEYERHOF (Philadelphie), que nous remercions vivement.

Nous opérons en milieu tamponné (solutions tampon de KING [59] au carbonate de sodium et de véronal pour des pH supérieurs à 8,3 ; tampon de MICKAËLIS [70] au véronal

sodique pour des pH compris entre 8,4 et 6,3 ; tampon acéto-acétique pour des pH compris entre 6,3 et 3,8).

TECHNIQUE DES ESSAIS. — Les divers réactifs du milieu d'hydrolyse sont mélangés (sauf dans des cas particuliers) dans les proportions suivantes : 1 cm³ de solution tampon est additionné de 1,5 cm³ d'une solution d'ester phosphorique M/10, de 0,5 cm³ de solution enzymatique, enfin de quantités variables d'HCl N/10 ou de NaOH N/10 suivant le pH. On complète à un volume total de 5 cm³ à l'aide d'eau distillée. Notons que l'enzyme est toujours ajouté en dernier lieu au mélange. L'adénylpyrophosphate de sodium est préparé à partir du sel de baryum (*). La concentration en P apportée par l'ester, est, dans chacun de nos essais : 0,93 mg./cm³ dans le cas des divers esters orthophosphoriques, 1,86 mg./cm³ dans le cas du pyrophosphate et 0,200 mg./cm³ dans le cas de l'adénylpyrophosphate. Nous opérons généralement en présence de magnésium ajouté sous la forme d'une solution aqueuse de sulfate de magnésium en quantité telle que la concentration en Mg⁺⁺ corresponde à qMg = 3 (**), concentration provoquant l'activation maximum de la phosphomonoestérase A₁ et de la pyrophosphatase de la muqueuse intestinale à son pH optimum d'action.

Les corps dont nous voulons étudier le comportement vis-à-vis des divers esters sont introduits sous forme de solution aqueuse, dont le pH a été préalablement ramené à celui de l'hydrolyse (vérification du pH par colorimétrie et, dans un certain nombre de cas, par des mesures à l'électrode de verre). Les tubes avant d'être portés à l'étuve sont plongés et demeurent trois à cinq minutes dans un bain-marie maintenu à 37°. Au bout de 30 minutes en général, l'hydrolyse est arrêtée à l'aide de 2 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Par filtration on élimine les protéines. Le phosphore libre est dosé par la micro-méthode de BRIGGS modifiée par ROBISON sur une partie aliquote du filtrat. Le dosage colorimétri-

(*) L'adénylpyrophosphate de sodium est préparé à partir du sel de baryum ainsi : 60 mg. d'adénylpyrophosphate de Ba sont dissous dans 3 cm³ d'HCl N/10. Par addition de 3 cm³ de SO₄H₂ N/10 nous précipitons le Ba à l'état de sulfate de Ba. La neutralité de cette solution est rétablie à l'aide de 6 cm³ de NaOH N/10. Par centrifugation nous recueillons le liquide surnageant qui est une solution d'adénylpyrophosphate de Na et dont la concentration en P est de 400 γ par cm³.

(**) Nous avons exprimé en unités qMg selon la notation logarithmique proposée par JENNER et KAY, les concentrations en magnésium des milieux étudiés, qMg étant égal à $-\log [\text{Mg}]$, expression dans laquelle [Mg] désigne la molarité en sel de magnésium.

que est fait à l'aide d'un colorimètre à cellule photoélectrique (Helcomètre) ou du photomètre de PULFRICH sur une quantité de filtrat contenant de 10 à 150 γ P. Les résultats obtenus ont été exprimés en p. 100 de substrat hydrolysé afin de faciliter leur comparaison ; de ce fait, nous avons parfois fait figurer dans nos tableaux des taux d'hydrolyse assez faibles. Ceux-ci n'en correspondent pas moins à des données expérimentales précises et significatives.

B. — Action de la phosphomonoestérase et de la phosphodiesterase brutes sur divers esters.

L'enzyme brut, tel que nous venons de décrire sa préparation, a été mis en présence de divers esters phosphoriques : du β -glycérophosphate de sodium, du méthylphosphate de sodium, du diéthylphosphate de sodium, du pyrophosphate de sodium, et de l'adénylpyrophosphate de sodium.

Sur chacun d'eux nous avons établi en premier lieu une courbe de l'activité en fonction du pH ; puis, le pH optimum d'hydrolyse étant connu, nous avons étudié l'action de divers corps susceptibles d'être activateurs ou inhibiteurs à des concentrations variables.

I. — DÉTERMINATION DU pH OPTIMUM D'ACTION.

1. *Phosphomonoestérase A₁*. — On trouvera dans le tableau I, un exemple des résultats obtenus sur la détermination du pH optimum d'activité de l'enzyme brut (lyoenzyme). Cette expérience a été faite en l'absence de Mg^{++} .

TABLEAU I. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme de l'intestin sur du β -glycérophosphate de sodium en fonction du pH (*)*.

pH.....	4,0	4,5	5,0	5,8	6,0	6,4	6,8
p. 100 de substrat hydrolysé.	1,29	1,29	3,1	4,0	5,8	6,95	13,1
pH.....	7,0	7,8	8,2	8,7	8,8	9,2	9,6
p. 100 de substrat hydrolysé.	14,6	23,8	31,0	54,5	59,0	64,5	62,5

(*) Dans tous nos tableaux les optima (de pH d'activation) ont été indiqués par l'impression en italique des valeurs qui leur correspondent.

Parallèlement à l'étude du lyoenzyme, nous avons établi quel est le pH optimum d'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par le desmoenzyme (***) en la présence et en l'absence d'ion Mg^{++} , lequel, pour BAMANN est moins fortement activateur des desmoenzymes que des lyoenzymes.

TABLEAU II. — *Activité phosphatasique relative du desmoenzyme de la muqueuse intestinale sur le β -glycérophosphate de Na en la présence et en l'absence de Mg^{++} .*

pH.....	6,4	6,7	7,0	7,2	7,5	7,9	8,2
p. 100 de substrat hydrolysé.	1,93	1,93	1,93	2,26	2,85	3,76	4,70
	1,93	1,93	1,93	2,26	2,69	3,76	4,70
pH.....	8,45	8,8	9,0	9,5	Observations		
p. 100 de substrat hydrolysé.	6,35	7,2	7,2	8,45	Pas de Mg^{++}		
	6,0	6,25	9,0	10,10	qMg = 3		

L'activité phosphomonoestérasique des préparations de muqueuse intestinale non purifiée sur le β -glycérophosphate de Na présente un seul pH optimum correspondant à pH = 9,2-9,5 pour le lyoenzyme comme pour le desmoenzyme ; elles ne renferment donc qu'une *phosphomonoestérase*, du type A_1 . L'addition d'ions Mg^{++} à la concentration de qMg = 3 exerce une action activatrice au pH optimum sur laquelle nous reviendrons. Ces faits sont en accord avec les données antérieurement établies par KAY, ROCHE, ROBISON et SOAMES.

2. *Phosphodiesterase*. — Nous avons déterminé sur ce substrat la courbe d'activité de l'enzyme en fonction du pH. Le diéthylphosphate dont nous partons est à l'état de sel de Ba. Nous avons éliminé le Ba par double décomposition à l'aide du sulfate de sodium en quantité telle qu'il soit en léger excès par rapport au baryum de notre prise d'essai. Nous traitons un poids déterminé de diéthylphosphate de baryum par la quantité correspondante de SO_4Na_2 . Par centrifugation nous recueillons le liquide clair surnageant, et, avec les eaux de lavage, nous complétons à un volume con-

(**) Suspension de muqueuse intestinale dans l'eau après autolyse de 8 jours à + 2° et lavages à l'eau distillée du résidu de centrifugation.

nu et tel que nous ayons une solution M/10. Nos essais portent sur 1,5 cm³ de substrat ainsi préparé dans un volume total de 5 cm³, ce qui correspond à une quantité de P introduite égale à 0,93 mg./cm³. Nous opérons en présence de SO₄Mg (qMg = 3). L'activité diestérasique d'une préparation de muqueuse intestinale non purifiée sur le diéthylphosphate de Na présente un optimum pour pH = 8,7 en présence de Mg⁺⁺, comme le montre le tableau III.

TABLEAU III. — *Activité de la phosphodiesterase intestinale brute sur le diéthylphosphate de Na en fonction du pH.*

pH	3,2	4,4	5,5	6,2	6,8	7,8
p. 100 de substrat hydrolysé.....	2,45	2,45	3,05	5,19	8,3	10,4
pH	8,4	8,7	9,2	9,5	10,5	
p. 100 de substrat hydrolysé.....	13,1	14,4	13,5	7,65	3,05	

La muqueuse intestinale contient donc *une* phosphodiesterase de pH optimum 8,7, valeur identique à celle observée antérieurement par BODANSKY et BAKWIN.

3. *Pyrophosphatase.* — Les tableaux IV et V indiquent les résultats obtenus sur l'activité du lyoenzyme et du desmoenzyme d'une préparation intestinale non purifiée, en présence de pyrophosphate de sodium, et en fonction du pH. Cette expérience a été réalisée dans le cas du desmoenzyme en la présence et en l'absence d'ion Mg⁺⁺.

TABLEAU IV. — *Activité du lyoenzyme intestinal sur le pyrophosphate de Na en fonction du pH.*

pH	3,4	4,0	4,8	5,4	5,88	6,52	6,96
p. 100 de substrat hydrolysé.....	11,8	11,7	6,5	7,2	7,35	9,35	9,9
pH	7,24	7,37	7,7	8,02	8,87	9,8	
p. 100 de substrat hydrolysé.....	15,5	18,1	21,8	26,5	16,9	14,3	

TABLEAU V. — *Activité du desmoenzyme intestinal sur le pyrophosphate de Na en présence et en l'absence de Mg^{++} et en fonction du pH.*

pH	6,4	7,1	7,6	7,9	8,1	8,4
p. 100 de substrat hydrolysé.....	1,69	1,39	1,52	1,88	2,33	3,0
	1,47	1,47	1,52	1,77	2,4	3,1
pH	8,7	9,1	9,4	Observations		
p. 100 de substrat hydrolysé.....	3,0	1,95	2,07	Pas de SO_4Mg		
	3,2	3,2	2,03	qMg = 3		

L'activité enzymatique d'une préparation de muqueuse intestinale non purifiée, sur le pyrophosphate de sodium présente, dans le cas du lyoenzyme un optimum d'action net correspondant à un pH de 8,02 et dans le cas du desmoenzyme un optimum d'action pour un pH égal à 8,7 (*).

La présence d'ions Mg^{++} à la concentration de qMg = 3 exerce une action activatrice au pH optimum.

CONCLUSION. — L'activité phosphatasique de l'extrait de muqueuse intestinale, non purifié, présente un optimum d'action de 9,0-9,2 vis-à-vis du β -glycérophosphate de sodium, de 8,7 vis-à-vis du diéthylphosphate de sodium et de 8,0-8,3 vis-à-vis du pyrophosphate de sodium. Pour un même substrat ce pH est légèrement plus alcalin dans le cas du desmoenzyme, que du lyoenzyme. L'addition d'ion Mg^{++} à la concentration de qMg = 3 se traduit par une action activatrice, sans déplacement du pH optimum.

Il existe donc dans la muqueuse intestinale une phosphomonoestérase, une phosphodiesterase et une pyrophosphatase.

2. ETUDE DE L'ACTION DE L'ION Mg^{++} .

Nous avons étudié l'activité des enzymes bruts, sur le glycérophosphate de sodium, et le pyrophosphate de sodium,

(*) La présence d'une pyrophosphatase à optimum acide est douteuse. Nous ne l'avons observée qu'irrégulièrement et elle peut être due à la présence de petites quantités de bactéries intestinales dans certaines préparations.

à leur pH optimum d'action respectif, en présence de sulfate de magnésium à des concentrations allant de $qMg = 1$ à $qMg = \infty$. Les tableaux VI et VII ont été établis à partir des résultats obtenus.

TABLEAU VI. — *Activité de l'enzyme intestinal brut sur le β -glycérophosphate de Na en fonction de la concentration en ion Mg^{++} .*

qMg .	1	2	2,5	3	3,5
p. 100 de substrat hydrolysé	53,0	53,0	55,0	53,0	49,0
qMg .	4	4,5	5	5,5	∞
p. 100 de substrat hydrolysé	43,7	49,4	48,0	48,0	48,0

TABLEAU VII. — *Activité de l'enzyme intestinal brut sur le pyrophosphate de Na en fonction de la concentration en ion Mg^{++} .*

qMg	1	2	2,5	3	3,5
p. 100 de substrat hydrolysé	40,7	40,5	44,0	43,5	40,7
qMg .	4	4,5	5	5,5	∞
p. 100 de substrat hydrolysé	40,0	34,6	40,0	36,8	36,8

La présence d'ions Mg^{++} favorise l'activité phosphatasique des lyoenzymes intestinaux non purifiés sur le β -glycérophosphate de Na et le pyrophosphate de Na. La concentration en Mg^{++} provoquant une activation maximum est la même pour ces deux substrats ; elle est égale à $qMg = 2,5-3$. Nous avons vu par ailleurs que le desmoenzyme est activé par Mg^{++} à la concentration de $qMg = 3$. Il y a lieu de remarquer que cette action est beaucoup plus minime que celle signalée par divers auteurs, en particulier JENNER et KAY.

3. ETUDE DE L'ACTION DES RÉDUCTEURS ET DE CORPS DÉRIVÉS.

L'étude du comportement de divers réducteurs : *acide ascorbique, cystéine, glutathion, SH_2 , SO_3Na_2 , KCN*, sur l'hydrolyse de différents esters par l'enzyme intestinal brut a été menée parallèlement sur le lyoenzyme et le desmoenzyme à leur pH optimum d'action respectif et en présence de Mg^{++} ($qMg = 3$) et de petites quantités de cuivre (SO_4Cu),

s'élevant à 10 γ par cm^3 des milieux d'hydrolyse (*). En ce qui concerne les corps oxydo-réducteurs, nous avons envisagé leurs actions sous les formes réduite et oxydée ; tel est le cas pour l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique, pour la cystéine et la cystine, le glutathion *G-SH* et *G-S-S-G*. Les essais ont été poursuivis suivant la technique exposée précédemment.

a) *Acides ascorbique et déhydroascorbique.*

Acide ascorbique. — L'action de l'acide ascorbique a été étudiée successivement sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, du méthylphosphate, du pyrophosphate, et de l'adénylpyrophosphate de Na, par les macérations intestinales brutes, en distinguant les « lyo » — et « desmoenzyme » dans le cas du glycérophosphate et du pyrophosphate de Na.

Hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

Lyoenzyme. — Nous avons fait agir des quantités croissantes d'acide ascorbique de l'ordre de 0,25 mg. à 12,5 mg. par cm^3 du mélange hydrolysant. La solution aqueuse d'acide ascorbique a été ramenée à $\text{pH} = 9$ immédiatement avant d'être répartie dans les divers essais. Plusieurs expériences ont montré l'irrégularité de l'action de ce réducteur, qui se traduit par une activation faible variant de 15 p. 100 à 25

TABLEAU VIII. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate de Na en fonction de la concentration en acide ascorbique, en la présence ou en l'absence d'ion Mg^{++} et à $\text{pH} = 9,2$.*

mg. ac. ascorbique par cm^3	0	0,25	0,50	1,25	Observations
p. 100 de substrat hydrolysé.	58,0 65,0	60,0 66,4	62,0 66,4	62,0 69,0	pas de Mg. qMg = 3
mg. ac. ascorbique par cm^3	2,50	6,25	12,50	Observations	
p. 100 de substrat hydrolysé	66,4 70,8	70,0 74,5	66,4 74,5	pas de Mg qMg = 3	

(*) L'addition de cuivre a pour but de favoriser l'autoxydation de l'acide ascorbique, de la cystéine, du glutathion par l'oxygène de l'air (acide ascorbique $\xrightarrow{\text{O}_2}$ acide déhydroascorbique ; 2 cystéine $\xrightarrow{\text{O}_2}$ 2 H + cystine ; 2 G-SH $\xrightarrow{\text{O}_2}$ 2 H + G-S-S-G).

p. 100 pour des concentrations élevées en vitamine C. Mg^{++} ($qMg = 3$) et Cu^{++} (10γ par cm^3) ne modifient pas sensiblement l'action de l'acide ascorbique, le pourcentage d'activation en présence de chacun de ces ions ou des deux restant le même que dans l'essai témoin.

Le tableau VIII indique l'activité phosphatasique relative, du lyoenzyme intestinal brut sur le β -glycérophosphate de Na à $pH = 9,2$ en fonction de la concentration en acide ascorbique. Une série d'expériences a été faite en l'absence de Mg^{++} , l'autre en sa présence ($qMg = 3$).

Desmoenzyme. — Nous avons repris les mêmes essais sur la suspension de muqueuse intestinale. L'action de l'acide ascorbique sur le β -glycérophosphate de Na en présence de cuivre (10γ par cm^3) et de Mg^{++} ($qMg = 3$) est rigoureusement nulle à des concentrations en acide ascorbique variant entre 0 et 5 mg. par cm^3 du mélange hydrolysant.

REMARQUE. — Pour une certaine concentration en acide ascorbique nous avons été gênés dans le dosage colorimétrique par une coloration bleue due à la présence d'acide ascorbique et dont l'intensité croissait avec la concentration. Cette difficulté n'est survenue que dans le cas du desmoenzyme où l'activité phosphatasique faible nous obligeait à prélever pour le dosage de grandes quantités du filtrat trichloracétique, ce qui nous apportait plus de 0,2 mg. d'acide ascorbique dans la prise d'essai. Après avoir défalqué des chiffres lus au colorimètre, ceux relatifs à une courbe témoin en acide ascorbique nous obtenions une série de chiffres semblables indiquant l'action nulle de la vitamine C sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par le desmoenzyme.

En résumé, ces expériences permettent de conclure à une activation irrégulière et minime de l'acide ascorbique sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par le lyoenzyme, en présence d'acide ascorbique, le desmoenzyme n'étant aucunement sensible à cette action.

Hydrolyse du méthylphosphate de sodium.

Nos essais ont été menés sur ce substrat, dont le radical alcoolique n'est susceptible qu'à un degré beaucoup moindre que le glycérol de s'oxyder biologiquement, d'une façon rigoureusement identique à celle adoptée pour l'hydrolyse du β -glycérophosphate par le lyoenzyme. Nous avons opéré en

présence de Mg^{++} à la concentration de $qMg = 3$ et à $pH = 9$. Les résultats indiqués par le tableau IX montrent une légère activation, atteignant son maximum pour des quantités de l'ordre de 6 mg. par cm^3 .

TABLEAU IX. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur l'hydrolyse du méthylphosphate de sodium à $pH = 9$ en présence d'acide ascorbique.*

mg. ac. ascorbique p. cm^3	0	0,25	1,25	2,50	6,25	12,50
p. 100 de substrat hydrolysé	43,7	45,9	48,0	52,1	54,6	54,6

Hydrolyse du pyrophosphate de sodium.

Lyoenzyme. — La vitamine C a une certaine action sur l'activité de la pyrophosphatase intestinale.

Pour de très faibles concentrations (0,25 mg. à 0,5 mg. par cm^3) on constate une inhibition de 25 à 35 p. 100, puis pour des quantités de l'ordre de 2,5 mg. par cm^3 , on retrouve l'activité du point de départ ; celle-ci continue à croître et

TABLEAU X. — *Activité phosphatasique relative de la pyrophosphatase intestinale en présence d'acide ascorbique.*

mg. ac. ascorbique par cm^3	0	0,25	0,50	1,25	Observations
p. 100 de substrat hydrolysé.	27,9	24,0	20,6	24,6	pas de SO_4Cu
	22,8	11,3	11,6	13,6	+ SO_4Cu
mg. acide ascorbique par cm^3	2,50	6,25	12,50	Observations	
p. 100 de substrat hydrolysé.....	26,2	32,6	30,2	pas de SO_4Cu	
	17,4	24,0	23,8	+ SO_4Cu	
mg. acide ascorbique par cm^3	0	0,25	0,50	1,25	Observations
p. 100 d'activation (+) ou d'inactivation (—)	0	—14,0	—26,2	—11,7	pas de SO_4Cu
	0	—50,0	—49,0	—10,0	+ SO_4Cu
mg. ac. ascorbique par cm^3	2,50	6,25	12,50	Observations	
p. 100 d'activation (+) ou d'inactivation (—)	— 6,1	+16,8	+ 8,2	pas de SO_4Cu	
	—23,7	+ 5,3	+ 4,4	+ SO_4Cu	

atteint pour la concentration de 6,25 mg. par cm^3 une activation qui peut varier entre 15 p. 100 et 40 p. 100. Enfin, cette activation décroît et n'atteint plus que 10 à 15 p. 100 pour une concentration en acide ascorbique égale à 12,5 mg. par cm^3 . Ces expériences ont été faites en présence de Mg^{++} . ($\text{qMg} = 3$) à un pH de 8,4, en l'absence ou en la présence de cuivre (2,5 γ Cu par cm^3). Le cuivre semble provoquer pour de basses concentrations en acide ascorbique une inhibition beaucoup plus forte. Toutefois, on ne note alors aucune activation lorsque l'on augmente la concentration en acide ascorbique ; on se borne à retrouver le pouvoir hydrolytique initial.

Desmoenzyme. — Le desmoenzyme semble très légèrement activé pour de fortes concentrations en acide ascorbique.

Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium.

L'action de l'acide ascorbique sur l'adénylpyrophosphate semble inverse de celle sur le pyrophosphate ; on constate, en effet, une légère activation pour de faibles concentrations en acide ascorbique, puis une forte inhibition pour de plus grandes quantités de vitamine C.

TABLEAU XI. — *Activité phosphatasique relative de la muqueuse intestinale sur l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium en présence d'acide ascorbique.*

mg. acide ascorbi- que par cm^3 ...	0	0,25	0,50	1,25	2,50	6,25	12,50
p. 100 de sub- trat hydrolysé.	51,0	52,5	55,5	50,0	47,0	36,0	13,7

En résumé, l'acide ascorbique a une action différente sur l'hydrolyse de divers esters par la phosphatase intestinale non purifiée.

1° Sur le β -glycérophosphate de Na, on peut noter une légère activation dans le cas du lyoenzyme, et une action nulle sur le desmoenzyme.

2° L'action sur la pyrophosphatase en fonction de la concentration en vitamine comporte une inhibition en présence de quantités minimales, puis l'inhibition devient de moins en moins forte quand la concentration augmente, et une petite activation peut se manifester pour un taux élevé de vita-

mine C. Le desmoenzyme est très peu sensible à l'action de l'acide ascorbique.

3° L'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium est inhibée pour d'assez fortes quantités d'acide ascorbique.

Acide déhydroascorbique. — Nous avons placé ici l'étude de l'acide déhydroascorbique afin de mieux établir la comparaison d'actions des formes réduite et oxydée du même corps.

L'acide déhydroascorbique a été préparé à partir de l'acide ascorbique par passage d'un courant d'air pendant une heure trente dans une solution d'acide ascorbique de $\text{pH} = 6,5$, maintenue à 50° , et en présence de cuivre (10γ par cm^3). Une partie aliquote de la solution est ensuite prélevée pour y doser l'acide ascorbique non oxydé à l'aide du 2-6-dichlorophénolindophénol. Il restait encore environ le cinquième de l'acide ascorbique, mais la quantité introduite dans nos essais est telle, que son action est négligeable (*). Cette solution a été ramenée au pH optimum respectivement de la phosphomonoestérase et de la pyrophosphatase.

Hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

L'étude comparée de l'acide déhydroascorbique sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate par le lyoenzyme et desmoenzyme montre des caractères différents. Ce corps est sans effet sur le lyoenzyme, même pour d'assez fortes concentrations (4 mg. par cm^3) ; par contre, il provoque une certaine inhibition du desmoenzyme.

Hydrolyse du pyrophosphate de sodium.

L'hydrolyse du pyrophosphate par le lyoenzyme n'est pas modifiée par l'addition d'acide déhydroascorbique. Il n'en est pas de même pour le desmoenzyme légèrement activé par ce corps, à l'inverse de ce qui se passe pour le glycérophosphate.

Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium.

L'acide déhydroascorbique active légèrement l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate par l'enzyme intestinal non purifié.

Les résultats de ces expériences, faites en présence de Cu^{++} (10γ par cm^3) sont les suivants :

(*) L'aération prolongée oxyde irréversiblement l'acide ascorbique, l'acide déhydroascorbique initialement formé étant à son tour transformé en une série de dérivés (acide dicétogulonique et autres). Nous avons préféré oxyder incomplètement l'acide ascorbique plutôt que de pousser sa transformation trop loin.

TABLEAU XII. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na en présence d'acide déhydroascorbique.*

mg. acide déhydroascorbique par cm ³	0	0,16	0,32	0,80	1,60	4,00
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé....	38,4	38,4	37,2	38,4	38,4	38,4
p. 100 pyrophosphate hydrolysé.....	16,7	15,4	15,4	14,8	14,8	17,5

TABLEAU XIII. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur l'adénylpyrophosphate de sodium en présence d'acide déhydroascorbique.*

mg. acide déhydroascorbique par cm ³	0	0,20	0,50	1,00
p. 100 de substrat hydrolysé	41,3	38,0	41,3	49,5

TABLEAU XIV. — *Activité phosphatasique relative du desmoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium en présence d'acide déhydroascorbique.*

mg. acide déhydroascorbique par cm ³	0	1	2	3
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé.	8,2	5,7	4,4	3,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé...	1,9	2,1	2,6	3,0

En résumé, l'acide déhydroascorbique n'agit pas sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate par les lyoenzymes intestinaux. Il inhibe celle du β -glycérophosphate et active légèrement celle du pyrophosphate dans le cas du desmoenzyme. L'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate par le lyoenzyme est peu sensible à la présence de cet acide.

L'action de l'acide ascorbique semble donc être en relation avec son pouvoir réducteur, ou tout au moins avec le groupement dicétonique — CO — CO — de ce corps.

b) *Cystéine et cystine.*

De même que pour les acides ascorbique et déhydroascorbique, nous avons étudié parallèlement l'action de la cystéine et de la cystine afin de relier éventuellement celle de la première à son groupement thiol.

Cystéine. — L'action de ce corps sur l'hydrolyse de divers substrats à leurs pH optimum d'action respectifs (9,2 pour le β -glycérophosphate et méthylphosphate ; 8 pour le pyrophosphate ; 7,5 pour l'adénylpyrophosphate) par les phosphatases intestinales brutes a fait l'objet de nos essais.

Hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

Lyoenzyme. — La cystéine a un effet nettement inhibiteur. Le pourcentage d'inhibition est variable suivant l'addition d'ions Mg^{++} et Cu^{++} , ou d'autres corps réducteurs, tels que l'acide ascorbique, ou oxydants, tels que l'acide monoiodacétique.

L'addition de Mg^{++} modifie très peu le taux de l'inhibition. Il semble que Mg^{++} ne protège que d'une façon minime l'enzyme contre l'inhibition par la cystéine. Le cuivre, au contraire, favorise cette inhibition, en même temps que l'autoxydation de la cystéine.

Les tableaux suivants indiqueront pour une concentration déterminée en cystéine, le pourcentage d'inhibition, en présence, ou en l'absence de l'un des ions métalliques ($qMg = 3$ et $Cu^{++} = 10 \gamma/cm^3$).

TABLEAU XV. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate de Na en présence de cystéine à pH = 9,0, en l'absence de Mg (A), en la présence de Mg (B) ou de Mg + Cu (C).*

A. — Pas de magnésium.					
mg. de cystéine par cm^3	0	0,20	1	2	5
p. 100 de substrat hydrolysé ...	89,0	63,0	46,0	38,0	32,2
p. 100 d'inhibition (—)	0	—29,2	—48,5	—57,3	—63,5
B. — Magnésium.					
mg. de cystéine par cm^3	0	0,20	1	2	5
p. 100 de substrat hydrolysé ...	83,0	66,5	51,0	40,0	35,0
p. 100 d'inhibition (—)	0	—19,3	—38,6	—52,0	—58,0
C. — Magnésium et cuivre.					
mg. de cystéine par cm^3	0	0,20	1	2	5
p. 100 de substrat hydrolysé ...	81,0	74,0	32,6	24,2	17,8
p. 100 d'inhibition (—)	0	—8,65	—60,0	—69,0	—78,0

Nous avons par ailleurs, essayé de coupler l'action de l'acide ascorbique, et de la cystéine. L'effet inhibiteur de la cystéine prédomine dans l'association : acide ascorbique + cystéine, mais il est certain qu'une partie de cet effet exercé par le thiol en l'absence de vitamine disparaît en la présence de celle-ci. Or, de nombreux auteurs estiment que l'acide ascorbique favorise l'oxydation de la cystéine par un mécanisme mal défini, un des produits d'oxydation de l'acide ascorbique pouvant former un couple oxydoréducteur avec le thiol.

Les tableaux XVI et XVII rendent compte de nos essais.

TABLEAU XVI. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme en présence de quantités fixes de cystéine (1 mg.,25 par cm³) et croissantes d'acide ascorbique sur le β -glycérophosphate de Na.*

mg. d'acide ascorbique par cm ³	(Témoin) pas de cystéine 0	cystéine seule 0	0,25	0,50
p. 100 de substrat hydrolysé...	78,0	11,5	13,35	13,2
p. 100 d'inhibition (—)	0	—85,0	—82,7	—83,0
mg. d'acide ascorbique par cm ³	1,25	2,50	6,25	12,50
p. 100 de substrat hydrolysé...	15,2	16,7	16,5	15,8
p. 100 d'inhibition (—)	—80,5	—78,5	—79,0	—80,0

TABLEAU XVII. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate de Na en présence de quantités fixes d'acide ascorbique et croissantes de cystéine + Cu⁺⁺.*

mg. de cystéine par cm ³	(Témoin) 0	1,25	2,50	6,25	Observations
p. 100 de subs- trat hydrolysé.	99,0	59,0	54,5	54,5	6 mg.25 d'acide ascor- bique par cm ³ . Pas d'acide ascorbi- que.
	73,5	29,4	22,0	16,1	
p. 100 d'inhibi- tion (—).....	—	—19,7	—26,0	—26,0	6 mg.25 d'acide ascor- bique par cm ³ . Pas d'acide ascorbi- que.
	—	—60,0	—70,0	—79,0	

L'inhibition de la phosphomonoestérase par la cystéine est donc fortement réduite (de 60 à 19,7 p. 100 en présence de 1,25 mg. de l'acide aminé) par l'acide ascorbique, sans qu'il soit toutefois possible de la faire disparaître entièrement. Ce fait témoigne de la complexité de l'action de la cystéine, que nous discuterons plus bas.

L'acide monoiodacétique contrecarre de la même façon l'effet inhibiteur de la cystéine. Cette dernière à la concentration de 1,25 mg. par cm^3 provoque une chute de l'activité égale à 59,8 p. 100, qui se réduit à 24 p. 100 par addition de $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$ en quantité telle qu'il soit à la concentration de M/100, concentration à laquelle il est sans action sur la phosphatase.

TABLEAU XVIII. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme sur le β -glycérophosphate de Na en présence de quantités fixes de cystéine (1 mg.,25 par cm^3) et croissantes de $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$.*

Mol. de $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$	(Témoin) sans cystéine ni $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$	(Témoin) sans cystéine $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$ M/1000	0	M/1000
p. 100 de substrat hydrolysé	77,0	78,0	31,0	33,2
p. 100 d'inhibition (—) ..	—	0	—59,8	—56,5
Mol. de $\text{CH}_2\text{I}-\text{COOH}$	M/500	M/250	M/100	
p. 100 de substrat hydrolysé	32,6	41,5	58,5	
p. 100 d'inhibition (—) ..	—57,5	—46,0	—24,0	

Desmoenzyme. — La cystéine a également un effet inhibiteur sur le desmoenzyme. Cette expérience a été faite en présence de cuivre et de magnésium.

TABLEAU XIX. — *Activité phosphatasique relative du desmoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate de Na en présence de cystéine.*

mg. de cystéine par cm^3	0	0,2	0,4	1	2
p. 100 de substrat hydrolysé...	6,75	4,35	3,78	2,4	2,4

Hydrolyse du méthylphosphate de sodium.

L'hydrolyse à $\text{pH} = 9$ du méthylphosphate par la phosphatase intestinale en présence de cystéine et de magnésium montre une assez forte inhibition.

TABEAU XX. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme sur le méthylphosphate de sodium en présence de cystéine.*

mg. de cystéine par cm^3	0	0,25	1,25	2,50	6,25
p. 100 de substrat hydrolysé . . .	52,5	31,6	24,7	22,2	16,5

Hydrolyse du pyrophosphate de sodium.

La cystéine a également une action inhibitrice sur l'hydrolyse du pyrophosphate, aussi bien sur le lyoenzyme que sur le desmoenzyme intestinal. Toutefois, cet effet est moins accusé que sur le β -glycérophosphate de Na. L'acide monoiodacétique ici aussi est un antagoniste de la cystéine.

Les tableaux ci-dessous, contiennent les résultats obtenus au cours de l'une de ces expériences qui ont été faites en présence de Cu^{++} ($10 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^3$) et de Mg^{++} ($\text{qMg} = 3$).

TABEAU XXI. — *Activité phosphatasique relative du lyo- et du desmoenzyme de l'intestin sur le pyrophosphate de Na en présence de cystéine.*

mg. de cystéine par cm ³	0	0,2	0,4	1	2
Lyoenzyme	11,0	11,0	11,0	9,5	6,2
p. 100 de substrat hydrolysé.					
Desmoenzyme	1,96	1,80	1,80	1,32	1,32

En résumé, la cystéine a un effet nettement inhibiteur sur l'hydrolyse de divers substrats par les phosphatases intestinales. Le β -glycérophosphate et le méthylphosphate sont beaucoup plus sensibles à cette action inhibitrice que le pyrophosphate de sodium. Sur chacun de ces esters le lyoenzyme et le desmoenzyme se comportent d'une façon à peu près identique, le desmoenzyme étant plus sensible à l'action des thiols.

Cystine. — La cystine n'a sensiblement pas d'action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par la phosphatase

intestinale. Elle inhibe très légèrement celle du pyrophosphate et de l'adénylpyrophosphate de Na.

TABLEAU XXII. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzymes intestinaux sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na en présence de cystine.*

mg. de cystine par cm ³	0	2	4
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	5,45	5,25	5,15
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé...	5,3	4,7	4,45

c) *Glutathion* (G-SH).

L'action du glutathion a été étudiée sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, du pyrophosphate et de l'adénylpyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales.

Hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

L'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na à pH = 9 par le lyoenzyme, et le desmoenzyme accuse une inhibition de 55 à 60 p. 100 avec une concentration en glutathion égale à 2 mg. par cm³, et en présence de Mg⁺⁺ et de Cu⁺⁺.

TABLEAU XXII bis. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzyme et desmoenzyme intestinaux sur le β -glycérophosphate de Na en présence de glutathion.*

mg. de glutathion par cm ³	0	0,2	0,4	1	2
Lyoenzyme	40,0	37,2	34,3	27,1	15,4
p. 100 de substrat hydrolysé					
Desmoenzyme	11,5	8,2	7,45	6,55	4,67

Hydrolyse du pyrophosphate de sodium.

En présence de Mg⁺⁺ et de Cu⁺⁺, le glutathion a un effet très légèrement inhibiteur, presque nul, sur l'hydrolyse du pyrophosphate par le lyoenzyme. L'hydrolyse par le desmoenzyme est inhibée pour de petites quantités de glutathion, activée pour de plus fortes. Ces résultats sont indiqués dans les tableaux ci-dessous :

TABEAU XXIII. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzyme et desmoenzyme intestinaux sur le pyrophosphate de Na en présence de glutathion.*

mg. de glutathion par cm ³	0	0,2	0,4	1	2
Lyoenzyme	15,5	15,5	15,0	15,0	13,1
p. 100 de substrat hydrolysé					
Desmoenzyme	3,38	2,34	2,52	3,94	4,47

Hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium.

Le glutathion à la concentration de 5 mg. par cm³, en présence de cuivre et de magnésium, produit une inhibition de 65 p. 100 sur l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate, par l'enzyme intestinal. Une inhibition de 55 p. 100 provoquée par une concentration en glutathion égale à 1 mg. par cm³ est réduite à 36 p. 100 par l'addition de 2,5 mg. par cm³ d'acide ascorbique.

En résumé, le glutathion inhibe assez fortement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par les lyoenzyme et desmoenzyme, beaucoup moins fortement celle du pyrophosphate de Na par le lyoenzyme. En sa présence, le desmoenzyme hydrolyse le pyrophosphate avec un très léger effet inhibiteur d'abord, puis activateur. Enfin, l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate est inhibée par le glutathion.

d) *Hydrogène sulfuré.*

SH₂ exerce une action inhibitrice sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na. Cette action est beaucoup plus forte sur le desmoenzyme que sur le lyoenzyme.

e) *Sulfite de sodium.*

Le sulfite de sodium aux concentrations M/1000 et M/500 n'a aucune action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par la lyophosphatase intestinale, alors qu'il inhibe très légèrement l'activité de cette même phosphatase sur le pyrophosphate de Na.

TABLEAU XXIV. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium en fonction de la concentration en sulfite de sodium.*

SO ₃ Na ₂	0	M/1000	M/500	M/50
p. 100 de substrat hydrolysé.....	45,0	40,5	35,8	38,2

f) *Cyanure de potassium.*

Le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na présentent vis-à-vis des cyanures une sensibilité réactionnelle différente. L'hydrolyse de ces deux corps est inhibée pour de fortes doses de KCN, mais pour de petites concentrations en cyanure, celui-ci active l'hydrolyse du pyrophosphate de Na par le lyoenzyme intestinal ($qMg = 3$). Le tableau ci-dessous donne une idée précise de ces faits.

TABLEAU XXV. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na en présence de CNK.*

CNK	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	84,0	86,0	81,0	75,0	50,5	25,8
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé	38,8	51,3	48,5	45,5	35,6	17,2

Une autre expérience sur le pyrophosphate portant sur des concentrations en CNK comprises entre M/3000 et M/1500 confirme cette activation initiale.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR L'ACTION DES RÉDUCTEURS.

On ne peut pas parler d'action systématique des réducteurs en général et celle des corps à groupement -SH, homogène sur un même enzyme, peut différer sur l'une et sur l'autre des phosphatases étudiées.

1° Pour un même substrat les actions des divers réducteurs sont différentes : l'acide ascorbique par exemple, active légèrement et irrégulièrement la monoestérase A₁, alors que la cystéine se comporte vis-à-vis d'elle comme fortement inhibiteur ; SH₂ et les sulfites ont une faible action sur l'estérase. Si donc il existe une action générale des réducteurs,

celle-ci est masquée par des actions spécifiques des divers corps étudiés.

2° Un même réducteur peut réagir différemment sur la phosphomonoestérase et sur la pyrophosphatase. L'acide ascorbique, active peu ou pas l'estérase et exerce une action d'abord inhibitrice, puis activatrice sur la pyrophosphatase suivant sa concentration. Le desmoenzyme n'est pas touché par ce corps. Quant à l'adénylpyrophosphate, son hydrolyse est ralentie en présence de la vitamine C.

3° En ce qui concerne les corps oxydo-réducteurs : acide ascorbique et cystéine, nous constatons dans le premier cas que les deux formes réduite et oxydée, ont en général un comportement différent, parfois inverse, vis-à-vis du même substrat.

Le tableau suivant schématise l'ensemble de nos résultats.

TABLEAU XXV bis. — Action de divers corps réducteurs ou de leurs dérivés sur l'activité des phosphatases intestinales brutes.

Corps étudiés		Acide ascorbique	Acide déhydro-ascorbique	Cystéine	Cystine	Glutathion	SH ₂	SO ₃ .Na ₂	KCN
β-Glycéro-phosphate	lyoenzyme	↗	0	↘	0	↘	↘	0	↘
	desmoenzyme..	0	↘	↘		↘	↘		
Méthyl-phosphate	lyoenzyme	↗		↘					
Pyrophosphate	lyoenzyme	↘↗	0	↘	0	0		↘	↗↘
	desmoenzyme..	0	↗	↘		0			
Adénylpyrophosphate	lyoenzyme	↘	↗		0	↘			

4. ACTION DES OXYDANTS.

Ce paragraphe a pour objet l'étude systématique de l'action d'oxydants divers : l'acide monoiodacétique, l'eau oxygénée et l'iode.

a) *Acide monoiodacétique.*

L'acide monoiodacétique ne modifie aucunement l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de Na par les lyoenzyme et desmoenzyme intestinaux. Dans le cas de l'adénylpyrophosphate de Na, il provoquerait une activation de 11,6 p. 100 pour une concentration en $\text{CH}_2\text{I-COOH}$ égale à M/100 (*).

TABLEAU XXVI. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur le β -glycérophosphate de sodium en présence d'acide monoiodacétique.*

$\text{CH}_2\text{I-COOH}$	0	M/432	M/216	M/108	M/72
p. 100 de substrat hydrolysé ...	70,0	70,0	70,0	69,0	70,5

TABLEAU XXVI bis. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme intestinal sur l'adénylpyrophosphate de Na en présence d'acide monoiodacétique.*

$\text{CH}_2\text{I-COOH}$	0	M/1000	M/500	M/100
p. 100 de substrat hydrolysé.	41,5	41,5	42,8	46,0

b) *Eau oxygénée.*

L'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na par les phosphatases intestinales (lyoenzyme et desmoenzyme) n'est pas influencée par la présence d'eau oxygénée. Le même corps est sans influence sur l'activité phosphatasique du desmoenzyme vis-à-vis du pyrophosphate de sodium, mais peut provoquer une légère activation dans le cas du lyoenzyme. Somme toute l'eau oxygénée est pratiquement sans action sur les phosphatases de l'intestin.

(*) Des expériences dont il n'y pas intérêt à indiquer ici le détail nous ont montré que la réaction des thiols (glutathion, cystéine) avec l'acide monoiodacétique, réaction dont le mécanisme est mal connu, libère des inhibiteurs des phosphatases. Il est sans doute responsable de ce phénomène.

TABLEAU XXVII. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzyme et desmoenzyme intestinaux sur le pyrophosphate de Na en présence d'eau oxygénée.*

H ₂ O ₂	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100
Lyoenzyme	41,0	42,2	40,7	48,5	46,0	45,2
p. 100 de substrat hydrolysé.....						
Desmoenzyme	3,4	3,1	3,1	3,1	3,2	

c) Iode.

L'iode inhibe fortement l'activité phosphatasique des lyoenzyme et desmoenzyme sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na, même à faible concentration.

TABLEAU XXVIII. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzyme et desmoenzyme intestinaux sur le β -glycérophosphate de Na en présence d'iode.*

Iode.....	0	M/1000	M/500	M/400	M/300	M/200	M/100	M/50
Lyoenzyme	77,5	72,5	57,5	45,7	15,0	4,95	4,6	4,15
p. 100 de substrat hydrolysé.....								
Desmoenzyme	7,7	4,8	4,5	2,1	2,1			

TABLEAU XXIX. — *Activité phosphatasique relative du lyoenzyme et du desmoenzyme intestinaux sur le pyrophosphate de Na en présence d'iode.*

Iode.....	0	M/3000	M/2000	M/1500	M/1000	M/750	M/500	M/400	M/300
Lyoenzyme	48,3	47,3	45,3	45,3	45,8	46,5	42,3		
p. 100 de substrat hydrolysé.....									
Desmoenzyme	2,67				2,5		1,74	1,24	0,9

CONCLUSIONS GÉNÉRALES SUR L'ACTION DES OXYDANTS.

Ici encore, nous ne pouvons envisager une action systématique de ces corps. Cependant, nous constatons que le β -glycérophosphate de sodium en présence d'oxydants est hydrolysé par les lyo- et desmoenzymes, en présentant soit une inhibition, soit une action nulle suivant l'oxydant employé, mais jamais d'activation.

Le pyrophosphate de sodium possède vis-à-vis de ces mêmes corps une sensibilité réactionnelle beaucoup plus irrégulière. Cette irrégularité se traduit pour les différents corps sur le lyoenzyme comme sur le desmoenzyme et pour un même oxydant on constate des réactions différentes suivant que l'une ou l'autre forme de l'enzyme est en jeu. Tous ces faits témoignent d'une absence d'effet général des agents d'oxydation sur ces enzymes.

Voici un tableau relatif à l'action des oxydants sur les divers substrats.

TABLEAU XXX. — Action des divers corps oxydants sur l'activité des phosphatases intestinales brutes.

Corps étudié		CH ₂ I-COOH	H ₂ O ₂	Iode
Glycérophosphate de Na	Lyoenzyme	0	0	↘
	Desmoenzyme..	0	0	↘
Pyrophosphate de Na	Lyoenzyme	0	↗ (?)	↘
	Desmoenzyme..	0	0	↘
Adénylpyro- phosphate de Na	Lyoenzyme	↗ (?)		

5. AUTRES ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DIVERS.

a) Oxalate de potassium.

L'oxalate de potassium n'a aucune action sur les enzymes intestinaux non purifiés hydrolysant soit le β -glycérophosphate, soit le pyrophosphate, soit l'adénylpyrophosphate de sodium.

TABEAU XXXI. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzymes intestinaux sur le β -glycérophosphate, et le pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium.*

Oxalate de potassium.	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	22,0	22,0	22,0	21,0	21,4	21,4	21,5
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.	23,3	23,0	23,0	22,8	23,8	22,8	23,3

b) *Fluorure de sodium.*

L'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium ne semble pas être influencée par la présence de ce corps.

TABEAU XXXII. — *Activité phosphatasique relative des lyoenzymes intestinaux sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de fluorure de sodium.*

NaF	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	21,5	21,5	21,9	21,4	22,3	22,3	22,3
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.	14,35				15,4	15,4	

c) *Acide cholique.*

L'enzyme intestinal non purifié hydrolyse le β -glycérophosphate de sodium en présentant une *très légère* inhibition pour une concentration en acide cholique égale à M/1000. Le pyrophosphate de sodium est insensible à cette action pour la même concentration, mais semble légèrement inhibé pour des quantités supérieures d'acide cholique. Le premier de ces faits n'est pas en accord absolu avec les résultats de BODANSKY selon lesquels la phosphatase intestinale se distingue des enzymes osseux et rénal par son insensibilité aux acides biliaires.

TABLEAU XXXIII. — *Activité phosphatasique relative des lyo-enzymes intestinaux sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence d'acide cholique.*

Acide cholique	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/125	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé... ..	39,1	39,1	31,9	31,9	31,9		
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.	9,85			10,2	10,2	9,45	7,7

d) *Glycocolle.*

Les tableaux suivants indiquent que le glycocolle est sans action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales brutes.

TABLEAU XXXIV. — *Activité phosphatasique relative des lyo-enzymes sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de glycocolle.*

Glycocolle	0	M/500	M/250	M/125	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	28,6	27,8	27,6	27,6	27,6
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.	8,7	8,3	8,3	8,7	8,7

Cette observation est en désaccord avec les résultats obtenus par BODANSKY sur des macérations intestinales de Chat, mais peut-être en est-il ainsi en raison de l'insuffisance de la dialyse de nos préparations, les acides aminés étant toujours inhibiteurs au delà d'un certain taux.

e) Zn^{++} et Alanine.

D'après HOVE et ses collaborateurs [46], une préparation de muqueuse intestinale de Rat mise en présence de β -glycérophosphate de sodium est activée par Zn^{++} lorsqu'elle est brute et inhibée quand elle a été dialysée 48 heures. Ces auteurs pensent à l'existence d'un coactivateur de Zn^{++} , produit d'autolyse de la muqueuse, qui serait éliminé par dia-

lyse. Les acides α -aminés (alanine) agiraient comme coactivateurs de Zn^{++} .

Nous avons repris ces expériences en nous plaçant exactement dans les mêmes conditions que celles requises par ces auteurs, mais en établissant un parallèle entre la muqueuse intestinale du Chien et du Rat.

Nous opérons en présence de β -glycérophosphate de sodium en quantité telle que nous introduisons 0,30 mg. P par cm^3 de mélange hydrolysant, le volume de la solution enzymatique employée étant le dixième du volume total. L'hydrolyse se poursuit pendant vingt heures. Nos essais sur la muqueuse de Rat ont confirmé ceux obtenus par HOVE ; par contre, nous avons trouvé des résultats différents en opérant sur le Chien.

1° *Sur le Rat* : Zn^{++} , apporté par SO_4Zn , provoque une activation sur la macération brute, et une inhibition sur la préparation dialysée. Mg^{++} active plus fortement la première que la deuxième et $\text{Zn}^{++} + \text{Mg}^{++}$ activent à peu près également l'une et l'autre. Enfin, l'alanine, et la somme : alanine + Zn^{++} se comportent en activateurs sur les deux préparations brute et dialysée, la somme de leurs actions propres étant inférieure à l'effet s'exerçant en présence de leur mélange après dialyse, et supérieure avant.

2° *Sur le Chien* : Les préparations brute et dialysée sont toutes deux inhibées par Zn^{++} . Mg^{++} active l'une et l'autre, mais plus fortement la solution dialysée. La somme $\text{Mg}^{++} + \text{Zn}^{++}$ a un effet activateur alors que la somme des valeurs algébriques de leurs pourcentages d'activation et d'inhibition donnerait un chiffre négatif. L'alanine est activateur sur les deux formes de préparation, mais plus nettement sur le dialysat. Les actions d'alanine + Zn^{++} dans l'un et l'autre cas semblent s'ajouter, ce qui se traduit par une inhibition quand on opère sur la macération brute, et une activation sur le produit dialysé.

Le tableau XXXV indique les pourcentages de substrat hydrolysé, et les pourcentages d'activation ou d'inhibition de préparations brutes et dialysées à base de muqueuse intestinale de Chien et de Rat, en présence de diverses quantités de Zn^{++} , de Mg^{++} , et d'alanine, dans l'une de nos expériences.

TABLEAU XXXV. — *Activité phosphatase relative de muqueuses intestinales de Chien et de Rat sur le β -glycérophosphate de Na à pH = 9,2 en présence de Zn^{++} , Mg^{++} , et d'alaine à diverses concentrations.*

Nature de l'essai	p. 100 de substrat hydrolysé				p. 100 d'activation (+) ou d'inactivation (—)			
	Chien		Rat		Chien		Rat	
	Brute	Dialysée	Brute	Dialysée	Brute	Dialysée	Brute	Dialysée
Témoin.....	5,3	1,6	27,4	29,2	—	—	—	—
Zn 0,01mM.....	4,6	—	—	25,9	— 13,0	—	—	— 11,3
Zn 0,03mM.....	3,5	1,4	33,8	22,8	— 34,0	— 15,6	+ 23,6	— 21,8
Zn 0,05mM.....	2,4	—	—	18,4	— 54,0	—	—	— 37,0
Zn 0,07mM.....	2,0	—	—	18,4	— 62,5	—	—	— 37,0
Mg 0,1mM.....	6,5	4,3	41,5	29,8	+ 23,5	+ 162,0	+ 52,5	+ 2,0
Alanine 1mM.....	6,6	6,2	28,4	35,8	+ 23,5	+ 274,0	+ 3,7	+ 22,6
Zn 0,03mM + Mg 0,1mM...	7,8	3,8	40,0	39,8	+ 47,0	+ 132,0	+ 46,5	+ 36,4
Zn 0,03mM + Alanine 1mM.	4,6	5,0	40,0	33,4	— 14,0	+ 200,0	+ 46,5	+ 14,4

f) *Ion* $PO_4^{=}$.

L'ion $PO_4^{=}$ inhibe l'activité phosphatasique de l'enzyme intestinal vis-à-vis de l'adénylpyrophosphate de sodium. Cette inhibition ayant lieu en présence de Mg^{++} est de 62 p. 100 pour une concentration en $PO_4^{=}$ de 0,2 mg. par cm^3 . Nous n'avons pas poursuivi d'expériences sur l'action du même ion sur les phosphomonoestérases et pyrophosphatases, celles de nombreux auteurs ayant montré que ces enzymes sont gênées par la présence de $PO_4^{=}$.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I.

1. Les macérations intestinales de Chien ayant subi une brève autolyse renferment un système enzymatique actif sur le β -glycérophosphate, le diéthylphosphate, le pyrophosphate et l'adénylpyrophosphate de sodium, et constitué par quatre enzymes agissant respectivement sur chacun de ces substrats.

2. Le pH optimum d'action de la phosphomonoestérase (A_1) est 9,2, celui de la phosphodiesterase 8,7, et celui de la pyrophosphatase 8,0 ; celui de l'adénylpyrophosphatase serait de 7,5 selon divers auteurs. Ces valeurs sont relatives aux lyoenzymes, le pH optimum d'action des desmoenzymes étant en général légèrement plus élevé.

3. L'ion Mg^{++} active également la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase à concentration optima de $qMg = 3,0$. Son action est plus faible que sur les enzymes d'autres organes.

4. L'acide ascorbique est faiblement activateur de la phosphomonoestérase et inhibiteur de la pyrophosphatase et de l'adénylpyrophosphatase à faible concentration, cette action inhibitrice de la pyrophosphatase étant maxima pour un taux voisin de 0,5 mg. par cm^3 . A la même concentration l'acide déhydroascorbique ne modifie pas sensiblement l'activité des phosphatases intestinales.

5. La cystéine, le glutathion (réduit) et l'hydrogène sulfuré sont fortement inhibiteurs de la phosphomonoestérase et de l'adénylpyrophosphatase, mais n'inhibent que très faiblement la pyrophosphatase. La cystine est inhibitrice mais à un degré beaucoup moindre ; de même le sulfite de sodium.

6. Le cyanure de potassium, faiblement activateur de la pyrophosphatase à concentration M/2000 est inhibiteur à un taux plus élevé. Il est inhibiteur à toute concentration pour la phosphoestérase.

7. L'acide monoiodacétique et l'eau oxygénée sont pratiquement sans action ; l'iode est inhibiteur de toutes les phosphatases intestinales.

8. Les oxalates et les fluorures alcalins sont sans action.

9. L'acide cholique est faiblement inhibiteur de la phosphomonoestérase.

10. Le zinc, à faible concentration, exerce une action activatrice couplée à celle des acides aminés (alanine) sur la phosphomonoestérase. Cette action est par ailleurs liée à celle du magnésium.

11. L'ensemble des faits observés, entre autres, l'action inverse de certains corps sur les activités phosphatasiques étudiées suivant leur concentration, suggère l'hypothèse que les caractères des enzymes bruts des macérations de muqueuse intestinale sont en partie dus à la présence de produits de l'autolyse cellulaire modifiant l'activité enzymatique. Il est dès lors indispensable de reprendre les essais d'identification de ces enzymes sur des préparations purifiées avant de pouvoir interpréter les résultats obtenus. C'est pourquoi le chapitre suivant est consacré à la purification des phosphatases intestinales.

12. L'existence de deux phosphatases alcalines isodynammes (CLOETENS) dans l'intestin est possible, mais nous ne la considérons pas *a priori* comme probable. En effet, les sensibilités à Mg^{++} et à KCN peuvent être modifiées quantitativement par des produits accompagnant l'enzyme et exerçant une action concurrente de la leur. Les différences observées à cet égard entre les desmoenzymes et les lyoenzymes sont sans doute justiciables de la même explication. De même, un défaut de couplage de plusieurs corps peut modifier la vitesse de l'hydrolyse du substrat, comme on l'observe dans le cas du zinc et de l'alanine ; il peut aussi être à l'origine des faits que CLOETENS considère comme démontrant l'existence de plusieurs phosphatases alcalines dans les organes.

CHAPITRE II.

ESSAIS DE PURIFICATION DES PHOSPHATASES DE LA MUQUEUSE INTESTINALE.

Il est difficile de définir les caractères d'un système enzymatique quand ses constituants ne sont pas isolés de leurs activateurs et inhibiteurs naturels. Les caractères qu'on leur attribue sont-ils propres aux enzymes ou au milieu complexe, cellulaire ou humoral ? Le problème sera en partie résolu dans le cas des phosphatases intestinales quand nous pourrions établir la comparaison entre le comportement des enzymes bruts, étudié dans le chapitre précédent, et celui des enzymes purifiés.

Ce chapitre est consacré aux essais de purification des constituants du système phosphatasique de la muqueuse intestinale. Les principaux buts de nos recherches ont été :

1. De séparer les enzymes de leurs activateurs ou inhibiteurs naturels susceptibles d'en masquer le caractère.
2. D'isoler la pyrophosphatase de la phosphoestérase.

Ces recherches de fractionnement ont été faites sur le lyo-enzyme et sur le desmoenzyme.

Divers principes mis en œuvre. — Les essais ont été basés sur divers principes qui sont les suivants :

1. Adsorption sur un composé organique ou minéral suivie d'élution, chacune de ces opérations étant faite à son pH optimum.
2. Chauffage de la macération ou de l'élution à divers pH et à diverses températures.
3. Précipitations fractionnées par l'acétone ou l'alcool de la macération, et des enzymes purifiés par adsorption et élution.

1. ADSORPTION ET ÉLUTION.

a) *Kaolin.*

Nos premiers essais de purification ont consisté en une adsorption des enzymes sur kaolin, à divers pH, à partir d'une macération de muqueuse intestinale.

Nous avons déterminé quel était le pH auquel l'adsorption était maxima à l'aide de deux expériences complémentaires qui consistent en ceci : mesurer l'activité estérasique et pyrophosphatasique du culot de centrifugation de kaolin (*) après adsorption à divers pH, ainsi que celles des différents liquides surnageant les adsorbats non élués.

Nous constatons sur un même essai que si l'activité phosphatasique de la suspension du culot de kaolin est forte, celle du liquide surnageant ce dernier est nulle ; inversement, si le précipité, présente une faible activité, la phosphatase n'a pas été adsorbée et se trouve encore dans la solution. Il est certain que ces expériences peuvent être troublées par l'inégalité de sensibilité des deux phosphatases aux divers pH ; mais, en fait, leurs résultats ont été très nets.

Le kaolin sur lequel nous opérons a été traité par HCl concentré pendant 20 jours, puis lavé à l'eau distillée jusqu'à la neutralité. Une série de sept essais, de pH variant de 4,0 à 9,0 a été préparée. Chacun de ces essais renferme 0,250 g. de kaolin pour 5 cm³ de macération intestinale (soit 1/20^e de kaolin) ; il est ajusté à un pH déterminé à l'aide d'un tampon approprié et d'HCl ou de NaOH N/10. Après une agitation mécanique de 30 minutes à 15-20° les différents culots et les liquides les recouvrant sont recueillis par centrifugation. Chacun des culots est mis en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée. Ces diverses suspensions et les liquides primitivement recueillis sont tous ramenés à pH = 7. Nous mesurons l'activité phosphatasique de ces deux séries d'échantillons, d'une part sur le β -glycérophosphate de sodium, d'autre part sur le pyrophosphate de sodium à leur pH optimum d'hydrolyse. Les résultats obtenus sont mentionnés dans les tableaux suivants :

(*) Mis en suspension dans le milieu d'hydrolyse renfermant du glycérophosphate ou du pyrophosphate de sodium.

XXXVI. — *Activité phosphatasique relative des divers culots d'adsorption sur le β -glycérophosphate de sodium et le pyrophosphate de sodium en fonction des pH d'adsorption respectifs.*

pH d'adsorption	4	4,95	6,24	6,78	7,50	8,28	9,06	Témoin
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé	37,3	32,2	18,75	9,45	6,9	6,9	3,8	98,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé	10,5	14,0	5,05	3,85	2,9	4,3	3,2	38,8

TABLEAU XXXVII. — *Activité phosphatasique relative des divers liquides surnageant les culots d'adsorption sur les β -glycérophosphate et pyrophosphate de sodium en fonction des pH d'adsorption.*

pH d'adsorption	4	4,95	6,24	6,78	7,50	8,28	9,06
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé	3,98	0,62	35,2	71,0	70,0	69,4	17,9
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé	2,36	2,2	18,9	22,8	24,3	25,8	10,8

Une autre expérience semblable a été mise sur une échelle de pH allant de 2,4 à 5,3 ; nous avons confirmé l'existence d'un *optimum d'adsorption* à $\text{pH} = 4,2$.

Les conditions pour lesquelles on a un maximum d'adsorption étant déterminées nous nous sommes préoccupés de l'élution des enzymes adsorbés. Les données précédentes ont montré qu'en milieu alcalin l'enzyme n'était pas adsorbé ; si donc nous mettons le culot en suspension dans de l'eau ammoniacale, la phosphatase sera relâchée et passera en solution par élution.

Le culot d'adsorption à $\text{pH} = 4,2$ obtenu comme il a été indiqué précédemment, est mis en suspension dans 2,5 cm³ d'ammoniaque à 1 p. 100 (ce qui nous donne un pH de 9). Après une agitation de quinze minutes, l'éluat est recueilli par centrifugation, et son activité phosphatasique est mesurée sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium. Le rendement de cette purification est de 40 p. 100 pour les deux phosphatases.

En résumé, l'adsorption ne se fait bien qu'à des pH compris entre 3,5 et 5 ; l'éluion est maxima à pH voisin de 9, et à cet égard la phosphomonoestérase et la pyrophosphatase se comportent identiquement. Il est donc possible, par adsorption et éluion, de purifier ces enzymes mais non de les fractionner.

b) Cholestérol.

Les essais suivants ont pour but de pousser encore plus loin les tentatives de purification, et d'essayer de séparer la pyrophosphatase de la phosphomonoestérase.

En premier lieu, l'enzyme est mis en éluion selon les conditions qui ont été indiquées. Cet éluat est ramené à pH = 5 (*), puis traité par une solution alcoolique de cholestérol à raison de 1,25 cm³ de solution alcoolique à 1 p. 100 pour 10 cm³ d'éluat. Il se forme au sein de ce mélange un précipité de cholestérol qui adsorbe l'enzyme et qui est recueilli par centrifugation. Ce culot est mis en suspension dans 10 cm³ d'ammoniaque à 1 p. 100. Après une agitation de quelques minutes, l'éluat obtenu par centrifugation est traité de nouveau par le cholestérol, exactement comme dans le premier cas, mais en dernier lieu le culot est repris par une quantité d'ammoniaque 8 fois plus petite que la quantité de macération dont on est parti, ce qui permet de concentrer l'activité enzymatique.

L'activité phosphatasique de cet éluat final est mesurée sur le β -glycérophosphate, le pyrophosphate et le diéthylphosphate de sodium à leurs pH optima d'action respectifs, en la présence et en l'absence de magnésium.

Substrat et addition de Mg ⁺⁺ .	Eluion (même volume) p. 100 de substrat hydrolysé	Macération initiale p. 100 de substrat hydrolysé
	—	—
β - Glycérophosphate. {	+ Mg ⁺⁺ 17,3 p. 100	98 p. 100
{	— Mg ⁺⁺ 13,6 —	
Pyrophosphate..... {	+ Mg ⁺⁺ 2,78 —	37 p. 100
{	— Mg ⁺⁺ 2,14 —	
Diéthylphosphate..... {	+ Mg ⁺⁺ 5,3 —	15 p. 100
{	— Mg ⁺⁺ 5,3 —	

(*) Par centrifugation on élimine les protéines qui précipitent à ce pH.

Ces résultats montrent que, sur la macération initiale, le pourcentage d'hydrolyse du pyrophosphate, est sensiblement le tiers de celui du glycérophosphate ; sur l'éluat final il est le sixième. Nous avons voulu savoir à quelle étape de la purification la pyrophosphatase était en partie éliminée. Pour cela nous établissons le rapport : p. 100 de glycérophosphate hydrolysé/p. 100 de pyrophosphate hydrolysé. Au fur et à mesure de la purification, nous constatons que ce rapport croît :

- 1° Sur la macération initiale : $G/P = 2,7$ (*).
- 2° Sur la première élution ammoniacale : $G/P = 3,7$.
- 3° Sur le liquide surnageant le 1^{er} précipité de cholestérol : $G/P = 3,7$.
- 4° Sur le liquide surnageant le 2^e précipité de cholestérol $G/P =$ indosable.
- 5° Sur l'élution finale $G/P = 9,7$.

Ce tableau montre que l'enzyme hydrolysant le pyrophosphate, passerait moins facilement en élution que la phospho-estérase ; il resterait fixé sur le cholestérol plus fortement que cette dernière. La pyrophosphatase serait bien adsorbée, mais mal élue.

En résumé, la combinaison de l'élution en milieu ammoniacal après adsorption sur kaolin en milieu acétoacétique à $pH = 4,2$, et de la double précipitation par le cholestérol nous permet d'avoir une préparation enzymatique relativement pure et dont l'activité vis-à-vis du pyrophosphate est minime, alors que le pouvoir estérasique demeure assez élevé. Toutefois, nous n'avons pas réussi à éliminer totalement la pyrophosphatase.

c) Acide stéarique.

Les mêmes essais de purification ont été effectués avec de l'acide stéarique, mais le rendement étant inférieur à celui obtenu à l'aide du cholestérol, nous n'avons pas poursuivi ces expériences.

d) Pyrophosphate d'argent.

Nous avons essayé d'adsorber spécifiquement la pyrophosphatase sur du pyrophosphate d'argent de la manière sui-

(*) Dans un grand nombre de macérations intestinales, ce rapport s'est montré voisin de 2,0 - 2,5.

vante : une certaine quantité de macération intestinale, est purifiée par adsorption sur kaolin, puis élution en milieu ammoniacal. Cet éluat est additionné de pyrophosphate de sodium neutralisé, et de nitrate d'argent. Il se forme un précipité qui est recueilli, puis mis en suspension dans de l'eau. Un courant de SH_2 décompose le pyrophosphate d'argent en précipitant du sulfure d'argent ; l'enzyme passe en solution ; par centrifugation, on sépare le précipité de sulfure, du liquide surnageant qui est soumis à une nouvelle purification par adsorption sur kaolin, puis élution en milieu ammoniacal. Avant cette dernière purification, nous avons chassé l'excès de SH_2 de la solution par un courant d'air.

L'activité phosphatasique de cet éluat sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium est extrêmement faible.

2. CHAUFFAGE A DIVERS pH ET A DIVERSES TEMPÉRATURES.

En vue de séparer l'estérase de la pyrophosphatase, nous avons fait des essais basés sur le chauffage à divers pH et à diverses températures de la préparation enzymatique avant de la faire réagir sur les différents produits.

Cas des lyoenzymes.

Les deux essais sont les suivants :

1. Chauffage de la macération à une température déterminée et à des pH variables.
2. Chauffage de la macération à un pH déterminé et à des températures variables.

1. Des lots de 10 cm³ de macération ont été portés en milieu tamponné à différents pH allant de 2 à 11. Chaque échantillon a été maintenu 20 minutes dans un bain-marie à 50°. Ensuite, tous ont été ramenés au même pH, aux environs de la neutralité, et à un même volume. L'activité phosphatasique de chacun a été mesurée sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium. Les résultats obtenus montrent qu'il nous a été impossible par ce moyen de séparer la pyrophosphatase de l'estérase. On observe un strict parallélisme entre les variations de l'activité phosphatasique sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium.

TABLEAU XXXVIII. — *Activité phosphatasique relative de macérations intestinales sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en fonction des pH auxquels les macérations ont été préalablement chauffées.*

pH de chauffage.....	2,10	3,00	4,04	4,95	6,24	6,78
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	1,7	1,7	49,0	60,5	62,0	56,5
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	2,6	2,8	20,2	18,6	21,6	21,6
pH de chauffage.....	7,50	8,28	9,00	9,88	10,98	Témoin non chauffé
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	56,5	60,5	53,0	5,6	1,2	64,5
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	23,2	22,3	22,2	3,6	3,0	32,2

Ces résultats indiquent par ailleurs que la stabilité des enzymes est assurée à son maximum, dans l'extrait brut, pour des pH compris entre 4 et 9.

La même expérience a été réalisée sur la macération intestinale purifiée par adsorption sur kaolin, puis élution en milieu ammoniacal. Elle a permis de constater encore un parallélisme entre les activités de l'estérase, et de la pyrophosphatase. Les deux enzymes purifiés sont stables entre pH = 3 et 6,5.

TABLEAU XXXIX. — *Activité phosphatasique relative de l'élution des enzymes intestinaux adsorbés au kaolin sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en fonction des pH auxquels l'élution a été préalablement chauffée.*

pH de chauffage.....	2,11	3,00	4,04	4,86	6,48	6,78
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	0,36	23,8	34,6	37,2	39,6	0,36
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	1,47	5,0	5,2	4,8	5,5	1,88
pH de chauffage.....	7,50	8,28	9,06	9,88	10,98	Témoin non chauffé
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	0,36	0,10	0,45	0,64	0,44	32,8
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	1,77	1,31	1,20	2,04	2,04	5,95

La purification retrécit donc de manière très appréciable la marge de stabilité des enzymes, qui deviennent alors très sensibles au chauffage à $\text{pH} > 6,5$. Ce fait montre qu'il ne faut pas attribuer de signification absolue à des données de cet ordre établies sur des extraits bruts.

2. En second lieu, nous avons essayé de chauffer la macération durant 10 minutes à diverses températures, et à un pH déterminé.

Plusieurs échantillons de macération intestinale tous ramenés à $\text{pH} = 9,2$ ont été portés respectivement 10 minutes à des températures s'échelonnant entre 37° et 58° . Une partie aliquote de chacun d'eux a été mise en contact avec du pyrophosphate, et du glycérophosphate de sodium à leur pH optima d'action respectif.

Les tableaux suivants montrent qu'il nous a été impossible de détruire isolément l'un ou l'autre enzyme, également inactivés à 58° dans les conditions de l'expérience. Cette température critique est très voisine de celles indiquées par UMEMO ($60-65^\circ$) pour la phosphatase A_1 du rein et par LÜERS et MALSCH (57°) pour la pyrophosphatase du malt.

TABLEAU XL. — *Activité phosphatasique relative de la macération sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en fonction des diverses températures auxquelles la macération a été chauffée à $\text{pH} = 9,2$.*

Température de chauffage	37°	46°	48°	50°	52°	54°	56°	58°
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	50,5	32,3	30,7	28,4	21,0	22,6	20,2	4,03
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	17,8	11,3	10,2	8,1	8,6	7,1	6,4	2,37

Cas des desmoenzymes.

L'essai de séparation des enzymes par chauffage préalable de la préparation phosphatasique, a été envisagé sur le desmoenzyme.

Une partie de la suspension de muqueuse intestinale est placée pendant une heure à l'étuve à 37° à $\text{pH} = 9,5$ et en la présence ou en l'absence de Mg^{++} ($\text{qMg} = 3$). On porte, en outre, pendant le même temps à 15° , deux lots de préparation enzymatique, avec ou sans Mg^{++} , mais à $\text{pH} = 9,5$. On fait

agir sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium à son pH optimum d'hydrolyse les deux suspensions avec et sans magnésium traitées à pH = 9,5, et les deux témoins non chauffés.

Les données suivantes indiquent que le chauffage n'altère pas les activités enzymatiques de l'estérase et de la pyrophosphatase. Le magnésium semble assurer la protection de l'enzyme au cours du chauffage.

Substrat et addition de Mg^{++} (qMg = 3)	Suspension chauffée p. 100 de substrat hydrolysé	Suspension non chauffée p. 100 de substrat hydrolysé
β - glycérophosphate		
} + Mg^{++}	12,9 p. 100	14,7 p. 100
} -- Mg^{++}	10,5 —	14 —
Pyrophosphate.		
} + Mg^{++}	3,25 p. 100	2,26 p. 100
} -- Mg^{++}	2,6 —	2,14 —

3. PRÉCIPITATIONS FRACTIONNÉES DES ENZYMES PAR L'ACÉTONE OU L'ALCOOL.

Cet essai de purification a pour principe l'élimination des protéines inactives par la précipitation fractionnée à l'aide d'alcool ou d'acétone, et le fractionnement des impuretés solubles dans les mélanges où la protéine précipite. La partie active qui a adsorbé l'enzyme au cours de sa précipitation est séparée du milieu alcoolique, séchée, puis mise en suspension aqueuse : la phosphatase passe en solution, alors que les protéines dénaturées par l'alcool restent insolubles.

Nous avons déterminé quelle est la quantité d'alcool ou d'acétone nécessaire pour obtenir un précipité dont l'activité enzymatique soit maximum. Dix cm^3 de macération sont traités par 4 cm^3 d'alcool à 95° ou d'acétone (purifié par distillation après un contact de 48 heures avec MnO_4K). Le précipité formé correspond à une concentration acétonique ou alcoolique de 40 p. 100 (la nomenclature de 40 p. 100 adoptée indique 40 parties d'alcool ou d'acétone pour 100 parties de macération). Ce précipité est séparé de la liqueur surnageante, laquelle est de nouveau traitée par 1 cm^3 d'alcool ou d'acétone (concentration de 50 p. 100), nous obtenons un nouveau précipité protéinique qui est, de même que le premier, mis de côté. Les liqueurs obtenues sont successivement enrichies en alcool ou acétone de façon à ce que l'on ait des concen-

trations respectivement de 75 et 100 p. 100. Nous n'avons pas étudié l'action de concentration plus élevée en solvant neutre, les précipités obtenus dans les conditions indiquées, étant déjà très riches en enzyme (*).

TABLEAU XLI. — *Activité phosphatasique relative de diverses fractions de la macération de muqueuse intestinale brute ou préalablement purifiée par adsorption (kaolin) et élution, séparées par précipitation alcoolique ou acétonique, sur le β -glycérophosphate et sur le pyrophosphate de sodium.*

A. — *Précipitation alcoolique de la macération.*

cm ³ d'alcool ajoutés p. 100 cm ³	Macération témoin	40	50	75	100
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé.....	60,5	12,9	24,3	27,6	14,9
p. 100 pyrophosphate hydrolysé.....	33,6	2,7	7,5	9,9	2,8

B. — *Précipitation acétonique de la macération.*

cm ³ d'acétone ajoutés par 100 cm ³	Macération témoin	40	50	75	100
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé.....	60,5	15,3	9,2	35,2	2,9
p. 100 pyrophosphate hydrolysé.....	33,6	2,9	1,8	16,9	1,3

C. — *Précipitation acétonique de l'éluat.*

cm ³ d'acétone ajoutés par 100 cm ³	Elution témoin	80	100	150	200
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé	25,4	1,4	4,9	20,2	9,6
p. 100 pyrophosphate hydrolysé.....	10,5	1,6	3,4	5,5	3,5

Les fractions de protéines ayant précipité aux diverses concentrations, sont mises séparément en suspension dans 5 cm³

(*) Il arrive souvent que, comme l'ont montré ALBERS et ALBERS [1 bis] au cours d'opération de même ordre, l'activité enzymatique de la somme des fractions obtenues soit supérieure à celle du produit brut initial. Ce fait est dû à l'élimination, par précipitation, d'inhibiteurs naturels solubles. Nous ne l'avons observé que pour la phosphoestérase.

d'eau distillée dans laquelle l'enzyme passe en solution. C'est l'activité de ces diverses préparations enzymatiques que nous avons étudiée.

Il résulte de l'étude de ces tableaux, qu'avec les macérations brutes, *la partie qui précipite à 40 p. 100 dans le cas de l'alcool, et à 50 p. 100 dans le cas de l'acétone est presque inactive, tandis qu'à 75 p. 100 dans les deux cas on récupère la plus grande partie de l'enzyme.*

Cette précipitation acétonique fractionnée a été également opérée sur un éluat de l'enzyme. L'enzyme a été purifié par adsorption sur kaolin, puis élution en milieu ammoniacal. Cet éluat a été traité par l'acétone en suivant rigoureusement la technique exposée précédemment. Il ne se trouble par addition d'acétone qu'à une concentration de celle-ci plus élevée que celle amenant une précipitation des macérations brutes dans l'éluat. *La partie la plus riche en phosphatase ne précipite qu'à 150 p. 100, soit à une concentration en acétone de 60 p. 100, dans le cas de l'estérase comme dans celui de la pyrophosphatase (*).* La macération soumise à ces divers traitements présente un certain degré de purification qu'il nous a été facile d'apprécier à l'aide d'un dosage d'azote par micro-kjeldahl sur la préparation enzymatique finale.

Une partie de cette préparation a été minéralisée en présence de SO_4H_2 pur et d'un catalyseur au sélénite de mercure. Le dosage de l'azote nous indique que la quantité présente dans notre solution est de 0,286 mg. par cm^3 , ce qui correspond à une teneur en protéines de $0,286 \times 6,5 = 1,86$ mg. par cm^3 . La purification par ce double traitement est beaucoup plus poussée qu'après une simple adsorption.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

La purification des enzymes par *adsorption* et *élution*, a permis d'obtenir, du fait de la concentration de l'éluat, des préparations dont l'activité enzymatique est supérieure à celle de la macération initiale (à volume égal) et très pauvres en protéines.

Au cours de la *précipitation fractionnée* par l'alcool ou

(*) La forte diversité des teneurs en alcool ou en acétone précipitant les enzymes dans les préparations brutes et les éluats tient sans doute à la grande richesse des premières en protéines qui adsorbent probablement la phosphatase. Les résultats obtenus sur les produits purifiés doivent être rapprochés de ceux d'ALBERS, pour lequel, la phosphoestérase purifiée précipite à des teneurs en acétone allant de 58 à 63 p. 100.

l'acétone la perte d'activité est inévitable mais l'intérêt de la méthode tient au fait que le degré de purification est plus poussé que dans le premier cas.

La combinaison des deux techniques, c'est-à-dire, la précipitation fractionnée effectuée sur un éluat concentré permet d'obtenir des préparations très pauvres en impuretés, et riches au point de vue enzymatique. Les caractères de ces enzymes aux différents degrés de leur purification feront l'objet du chapitre suivant.

Il n'a été possible de séparer quantitativement la pyrophosphatase de la monoestérase ni par adsorption (kaolin, cholestérol, acide stéarique, pyrophosphate d'argent), ni par chauffage à divers pH et à diverses températures, ni par précipitation alcoolique ou acétonique fractionnée. Toutefois l'adsorption au cholestérol permet d'éliminer en partie la pyrophosphatase des préparations de phosphomonoestérase.

Dans l'ensemble ces opérations ont permis de purifier les enzymes, mais non de les fractionner.

CHAPITRE III.

CARACTÈRES DES PHOSPHATASES INTESTINALES PURIFIÉES.

Les chapitres précédents ont été consacrés à l'étude de l'action de divers corps, ions, oxydants, réducteurs ou autres, sur l'hydrolyse de différents esters par les enzymes bruts et la purification de ceux-ci. Les expériences que nous allons exposer ont pour but d'étudier le comportement des enzymes à l'égard des oxydants et des réducteurs, aux divers stades de leur purification.

Afin de simplifier notre rédaction, nous allons désigner chacun des procédés employés par une lettre.

A. La purification consistant en une simple *adsorption des enzymes au kaolin en milieu acétoacétique* de $pH = 4,2$; c'est une suspension aqueuse du culot de kaolin qui est alors mise en expérience.

B. La purification a été obtenue par *élution en milieu ammoniacal* (NH_3 1 p. 100) *de l'enzyme adsorbé sur kaolin* (A).

C. La purification est réalisée par *précipitation alcoolique* à 75 p. 100 (75 parties d'alcool + 100 parties de macération soit 75 pour 175). On opère sur la *solution aqueuse obtenue par macération du précipité alcoolique*.

D. La purification par *précipitation acétonique* à 75 p. 100 est faite dans les mêmes conditions que C.

E. La purification a été obtenue par *précipitation acétonique suivie d'une adsorption* à $pH = 4,2$ *et d'une élution* à $pH = 9,0$.

F. La purification par *adsorption* à $pH = 4,2$, *élution* à $pH = 9,0$ *suivie d'une précipitation par l'acétone* à concentration de 75 p. 100 (75 parties d'acétone dans un volume total de 100) *et reprise par l'eau du précipité* constitue le dernier procédé mis en œuvre.

1. ACTION DU MAGNÉSIUM.

L'action du magnésium a été étudiée sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales purifiées. La préparation enzymatique a été purifiée par précipitation acétonique de l'éluat (purification F) en suivant la technique exposée au chapitre précédent. L'activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en fonction de la concentration en sel de magnésium correspond aux données du tableau suivant :

TABLEAU XLII. — *Activité phosphatasique relative des phosphatases de la muqueuse intestinale purifiées (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en fonction de la concentration en Mg^{++} .*

qMg.	1	2	2,5	3	3,5
p. 100 β -glycérophosphate hydrolysé	18,70	18,70	19,50	18,70	18,60
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé....	1,35	4,85	4,10	4,15	4,10
qMg.	4	4,5	5	5,5	∞
p. 100 β - glycérophosphate hydrolysé.....	16,70	15,90	15,90	15,90	15,90
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	3,52	3,96	3,87	4,05	3,94

Il résulte de l'étude de ce tableau que :

1. Le magnésium possède une action activatrice vis-à-vis de l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales purifiées. Cette action est maxima pour une concentration égale à $qMg = 2,5$ dans le cas du glycérophosphate et $qMg = 2,0$ dans celui du pyrophosphate.

2. La concentration en magnésium donnant une activation maxima est sensiblement la même pour les enzymes bruts et purifiés.

3. Les pourcentages d'activation n'ont pas varié sensiblement au cours de la purification. Ils demeurent nettement plus faibles pour la phosphomonoestérase alcaline de l'intes-

tin que pour celle du rein, de l'os, d'après les données établies par JENNER et KAY.

2. ACTION DES RÉDUCTEURS ET DE CORPS DÉRIVÉS.

De même que dans le cas de l'enzyme brut, nous avons étudié simultanément l'action de l'acide ascorbique et celle de l'acide déhydroascorbique, celle de la cystine et celle de la cystéine. Le protocole expérimental est semblable à celui adopté au cours des expériences précédentes.

Nous avons étudié l'action de chacun des réducteurs suivants : acide ascorbique, cystéine, glutathion, sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium au pH optimum par les enzymes intestinaux purifiés. Toutes les expériences ont été faites en présence de Mg^{++} ($qMg = 3$) et de Cu^{++} (10γ par cm^3).

a) Acides ascorbique et déhydroascorbique.

Acide ascorbique. — L'action de l'acide ascorbique a été étudiée parallèlement sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les enzymes aux divers stades de leur purification.

TABLEAU XLIII. — *Activité relative des phosphatases intestinales purifiées par divers procédés (A, B, C, D, E, F,) en présence d'acide ascorbique à concentration croissante.*

mg. d'acide ascorbique par cm^3	0	0,25	0,50	1,25	2,50	6,25	12,50
I. — <i>Purification A (adsorption).</i>							
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	65,0	66,0	67,0	69,5	73,5	76,5	88,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé..	15,4	8,75	10,3	13,0	13,4	16,2	18,1
p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (-)	glycérophosphate	+ 1,5	+ 3,4	+ 6,9	+13,0	+17,7	+35,4
	Pyrophosphate	—43,0	—33,0	—15,6	—13,0	+5,2	+17,5

TABLEAU XLIII (suite).

mg. d'acide ascorbique par cm ³	0	0,25	0,50	1,25	2,50	6,25	12,50
II. — <i>Purification B</i> (adsorption et élution).							
p. 100 de β -glycéro- phosphate hydro- lysé.....	56,4	56,4	56,4	58,0	62,0	68,5	70,8
p. 100 de pyrophos- phate hydrolysé..	9,3	6,3	6,3	6,95	8,25	10,6	9,65
p. 100 d'activation (+) ou d'inhibition (—)	glycéro- phosphate	0	0	+ 2,8	+ 10	+ 21,5	+ 25,6
	pyrophos- phate	—32,4	—32,4	—25,2	—10,7	+14,0	+3,76
III. — <i>Purification C</i> (précipitation alcoolique).							
p. 100 de β -glycéro- phosphate hydro- lysé.....	64,0	60,6	60,6	64,5	68,0	85,0	85,0
p. 100 de pyrophos- phate hydrolysé..	8,5	6,0	6,25	7,9	9,35	11,85	14,2
p. 100 d'activation (+) ou d'inacti- vation (—)	glycéro- phosphate	—5,32	—5,30	+0,78	+6,25	+32,8	+32,8
	Pyrophos- phate	—29,4	—23,6	— 7,0	+ 9,4	+38,8	+67,0
IV. — <i>Purification D</i> (précipitation acétonique).							
p. 100 de β -glycéro- phosphate hydro- lysé.....	49,0	45,8	45,8	47,0	49,0	49,0	49,0
p. 100 de pyrophos- phate hydrolysé..	2,0	2,0	2,2	2,6	2,9	3,9	6,5
p. 100 d'activation (+) ou d'inacti- vation (—)	glycéro- phosphate	— 6,5	— 6,5	— 4,1	0	0	0
	pyrophos- phate	0	+ 1,0	+32,0	+45,0	+98,0	+225,0

TABLEAU XLIII (suite).

mg. d'acide ascorbique par cm ³	0	0,25	0,50	1,25	2,50	6,25	12,50
V. — <i>Purification E</i> (précipitation acétonique, adsorption, puis élution).							
p. 100 de β -glycéro- phosphate hydro- lysé	50,0	51,5	52,5	54,0	58,5	60,5	
p. 100 de pyrophos- phate hydrolysé..	12,0	10,6	10,4	11,5	12,7	15,7	
p. 100 d'activation (+) ou d'inacti- vation (—)	glycéro- phosphate	+ 3,0	+ 5,0	+ 8,0	+17,0	+21,0	
	pyrophos- phate	—11,7	—12,9	— 4,1	+ 5,8	+30,8	
VI. — <i>Purification F</i> (adsorption, puis élution précipitée par l'acétone).							
p. 100 de β -glycéro- phosphate hydro- lysé	32,4	—	36,6	37,2	36,6	37,8	
p. 100 de pyrophos- phate hydrolysé..	6,95	5,1	6,05	5,65	6,65	8,25	10,0
p. 100 d'activation (+) ou d'inacti- vation (—)	glycéro- phosphate	—	+13,0	+15,4	+13,0	+16,8	
	pyrophos- phate	—26,6	—13,0	—18,7	—4,35	+18,7	+44,0

En résumé, la purification ne modifie sensiblement pas le comportement des activités phosphatasiques relatives vis-à-vis du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'acide ascorbique, à concentration croissante.

La phosphoestérase présente un pourcentage d'activation à peu près semblable à celui obtenu avec l'enzyme brut ; sauf toutefois pour des concentrations faibles, pour lesquelles il peut même exister une inhibition minime, dans le cas de la purification par précipitation alcoolique et acétonique.

La pyrophosphatase présente toujours pour de faibles concentrations en acide ascorbique, une chute de l'activité, tou-

tefois moins accusée que dans le cas de l'enzyme brut. Pour de fortes concentrations, le pourcentage d'activation est supérieur à celui obtenu avec l'enzyme non purifié, tant pour le pyrophosphate que pour le β -glycérophosphate au cours d'une purification poussée.

Acide déhydroascorbique. — L'étude de l'action de l'acide déhydroascorbique sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium et du pyrophosphate de sodium par l'enzyme soumis à la purification F (c'est-à-dire élution précipitée par l'acétone) a donné les résultats suivants :

Purification F.

TABLEAU XLIV. — *Activité des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence d'acide déhydroascorbique.*

mg. d'acide déhydroascorbique par cm ³	0	0,20	0,40	1	2	5
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	39,8	38,8	39,8	38,8	37,6	36,4
p. 100 de pyrophosphate hy- drolysé.....	11,1	11,1	11,1	10,6	11,5	12,3
p. 100 d'acti- vation (+) ou d'inacti- vation (—)	glycérophosphate... pyrophosphate.....					
	—2,5	0	—2,5	—5,5	— 8,6	
	0	0	—4,5	+4,0	+10,8	

L'acide déhydroascorbique semble inhiber légèrement l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium, et activer dans les mêmes proportions celle du pyrophosphate de sodium par l'enzyme purifié par précipitation acétonique de l'élution. En fait son action est pratiquement nulle.

b) Cystéine et Cystine.

Cystéine. — *La cystéine inhibe l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les enzymes purifiés.*

Les tableaux suivants mentionnent les résultats obtenus au cours d'expériences dans lesquelles l'enzyme aux divers sta-

des de sa purification a hydrolysé le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de cuivre, de magnésium, et de quantités croissantes de cystéine.

TABLEAU XLV. — *Activité phosphatasique relative de l'enzyme intestinal soumis à diverses purifications sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium en présence de cystéine* (pourcentages de substrat hydrolysé dans des conditions identiques).

mg. de cystéine p. cm ³ .	Purif. A	Purif. B	Purif. C	Purif. D	Purif. E	Purif. F
0 mg. (témoin).....	65,0	64,8	58,0	49,0	62,5	36,4
0,2 mg.		56,0	24,6	14,8	51,5	14,4
0,4 mg.		24,4				13,5
1 mg.		21,3	19,4	9,8	13,7	9,55
2 mg.	22,8	18,5	15,5	8,15	11,9	7,22
5 mg.	21,2		11,6	6,7		

Il est remarquable que l'action de la cystéine soit beaucoup plus forte sur l'enzyme purifié que sur l'enzyme brut.

La même expérience a été réalisée sur le pyrophosphate de sodium dont voici les résultats :

TABLEAU XLVI. — *Activité phosphatasique relative de l'enzyme intestinal soumis à diverses purifications sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium en présence de cystéine.*

mg de cystéine p. cm ³ .	Purif. A	Purif. B	Purif. C	Purif. D	Purif. E	Purif. F
0 mg (témoin).....	15,4	34,0	15,2	2,1	15,0	9,1
0,2 mg.		26,0	11,6	2,1	9,5	9,1
0,4 mg.		28,0				8,55
1 mg.		18,9	10,7	2,9	7,95	7,2
2 mg.	8,05	10,8	9,0	3,32	4,55	4,8
5 mg.	9,25		8,8	3,96		

La cystéine a un effet nettement inhibiteur sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium par la phosphatase intestinale purifiée. Cette action est, ici encore, plus forte que sur l'enzyme brut.

Cystine. — L'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par l'enzyme purifié par précipitation acétonique de l'éluat a été étudiée en présence de cystine.

A de faibles concentrations elle agit en inhibiteur sur le pyrophosphate et en activateur sur le glycérophosphate.

TABLEAU XLVII. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de cystine.*

mg. de cystine par cm ³	0	0,2	0,4	1	2	4
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	7,2	9,3	10,0	9,3	5,2	5,37
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	3,05	2,7	1,96	0,94	3,08	2,9

En présence de l'enzyme intestinal purifié, la cystine paraît avoir une action inverse sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium. Dans le cas du premier substrat, elle active pour de faibles concentrations et inhibe pour de plus fortes. C'est le contraire qui a lieu dans le cas du pyrophosphate. Toutefois, on ne saurait comparer en intensité l'action de la cystéine à celle de la cystine, beaucoup moins forte.

c) *Glutathion. (G-SH).*

Nous avons étudié l'action du glutathion sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases intestinales purifiées soit par adsorption et élution (B), soit par précipitation acétonique de l'éluat (F).

Le glutathion inhibe l'hydrolyse du β -glycérophosphate, et de l'adénylpyrophosphate et, à un degré beaucoup moindre celle du pyrophosphate par l'enzyme purifié.

Tout se passe donc comme si les enzymes purs étaient inhibés par G-SH, tandis que les produits bruts ou les moins purifiés contenaient des produits masquant plus ou moins l'action de -SH. Il est possible que le glutathion ait une action complexe, dans laquelle entre en jeu comme élément activateur la chaîne polypeptidique et comme élément inhibiteur la fonction thiol. Cette hypothèse expliquerait l'action faiblement activatrice de concentrations peu élevées du tripeptide et son effet inhibiteur à des taux supérieurs, car l'action des acides aminés et des polypeptides est activatrice à $C = M/1000-2000$ et inhibitrice à $M/50$ environ.

TABLEAU XLVIII. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium, du pyrophosphate de sodium, et de l'adénylpyrophosphate de sodium en présence de glutathion.*

mg. de glutathion par cm ³	0	0,20	0,40	1	2
I. — <i>Purification B</i> (adsorption et élution).					
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	65,0	66,5	66,5	59,5	46,5
II. — <i>Purification F</i> (adsorption et élution suivie de précipitation par l'acétone à 75 p. 100).					
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	36,4	40,9	40,9	35,6	20,4
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	9,1	9,1	9,1	8,85	7,9
p. 100 d'adénylpyrophosphate hydrolysé.....	39,4		33,2	29,0	15,3

Nous avons voulu coupler le glutathion soit réduit, soit oxydé avec l'acide monoiodacétique, et étudier leur action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les phosphatases soumises à la purification B. Ce couple agit sur l'hydrolyse en présentant une inhibition dans le cas du glutathion réduit, et une action nulle dans l'autre. En fait, nous avons constaté que l'inhibition était due à l'iode libéré au cours de la réaction : Glutathion réduit + CH_2ICOOH .

d) *Cyanure de potassium.*

L'action du cyanure de potassium a été étudiée en présence de magnésium sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les enzymes intestinaux toujours soumis à la même purification (F).

TABLEAU XLIX. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de CNK.*

CNK.....	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	36,0	36,0	35,0	24,2	11,9	6,7
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	13,7	15,5	15,5	14,9	13,9	11,8

Le cyanure de potassium a une action inhibitrice très nette sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium par l'enzyme intestinal purifié.

Le pyrophosphate de sodium présente pour de faibles concentrations en CNK une activation qui disparaît pour de plus fortes doses, lesquelles sont faiblement inhibitrices.

CONCLUSION SUR L'ACTION DES RÉDUCTEURS.

L'action des réducteurs sur l'hydrolyse de divers esters par les enzymes intestinaux purifiés est différente pour chacun d'eux et varie également avec le substrat :

L'acide ascorbique active l'hydrolyse du β -glycérophosphate ainsi que celle du pyrophosphate de sodium pour de fortes concentrations ; pour de faibles doses, on note une inhibition pour la pyrophosphatase et une activation minime de la phosphoestérase. L'acide déhydroascorbique est pratiquement sans action sur les deux enzymes.

La cystéine et, à un degré moindre, la cystine, inhibent l'action des deux phosphatases intestinales. Toutefois la cystéine est un agent d'inhibition incomparablement plus actif.

Le glutathion inhibe l'hydrolyse du β -glycérophosphate et de l'adénylpyrophosphate de sodium ; son action sur celle du pyrophosphate de sodium est minime.

Les résultats obtenus à faible concentration en ces corps sont schématisés ci-dessous :

	Acide ascorbique	Acide déhydro-ascorbique	Cystéine	Cystine	Glutathion
Glycérophosphate.	↗	0	↘	faible ↘	faible ↘
Pyrophosphate ...	↘	0	↘	↘	très faible ↘
Adénylpyrophosphate					↘

3. ACTION DES OXYDANTS.

Nous avons étudié l'action de quelques oxydants : acide monoiodacétique, eau oxygénée, ferri-cyanure et perborates sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par l'enzyme intestinal purifié par précipitation

acétonique de l'éluat d'enzyme adsorbé sur kaolin. Les corps sont introduits sous forme de solution aqueuse amenée préalablement au pH optimum d'hydrolyse.

a) *Acide monoiodacétique.*

Cet oxydant a une *action rigoureusement nulle* sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate, et du pyrophosphate de sodium par les enzymes intestinaux purifiés en présence de magnésium.

b) *Eau oxygénée.*

Les quantités d'eau oxygénée que nous avons fait agir varient de M/2000 à M/250. L'expérience a été faite en présence de Mg^{++} (qMg = 3).

TABLEAU L. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence d'eau oxygénée.*

H ₂ O ₂	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé	28,6	31,6	29,8	27,7	33,2
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	5,1	5,3	5,1	5,1	5,1

Ces résultats nous indiquent que *l'eau oxygénée est sans action* sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium, et pratiquement nulle sur celle du β -glycérophosphate de sodium. Il est possible que la très légère activation notée dans ce cas tienne à une action sur une impureté inhibitrice (métal).

c) *Ferricyanure de potassium.*

La même expérience a été répétée sur le ferricyanure de potassium.

TABLEAU LI. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de ferricyanure de potassium.*

FeCy ₆ K ₃	0	M/3000	M/2000	M/1000
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	31,6	31,6	30,0	31,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	6,7			6,4

Le ferricyanure de potassium est sans action sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium.

d) *Perborate de sodium.*

L'étude du perborate a été faite en présence d'ions Mg^{++} .

Les résultats mentionnés dans le tableau suivant indiquent l'action nulle de cet oxydant sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium, et la légère inhibition de l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium.

TABLEAU LII. — *Activité phosphatasique relative d'enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence de perborate de sodium.*

Perborate de Na.....	0	M/2000	M/1000
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	23,7	22,7	20,3
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	4,0	4,3	4,3

CONCLUSION SUR L'ACTION DES OXYDANTS.

L'étude de l'action des oxydants sur l'hydrolyse des divers esters par l'enzyme brut ne nous a pas permis d'envisager une action spécifique de ces corps. Il en est de même pour le cas concernant l'enzyme purifié.

4. ACTION D'AUTRES ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DIVERS.

a) *Oxalate de potassium.*

L'étude de l'action de l'oxalate sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de Na et du pyrophosphate de Na par l'enzyme intestinal purifié par précipitation acétonique de l'éluat, a donné les résultats mentionnés ci-dessous.

TABLEAU LIII. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium en présence d'oxalate de potassium.*

Oxalate de K.....	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	7,4	6,45	6,45	4,55	5,7	6,45	6,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	6,15	6,0	6,1	6,05	5,55	5,75	5,50

L'hydrolyse du pyrophosphate de sodium et celle du β -glycérophosphate de sodium sont faiblement inhibées par les oxalates alcalins. Cette inhibition disparaît pour de plus grandes quantités d'oxalate (neutralisation possible de l'effet inhibiteur de PO_4^- libéré par la réaction).

b) *Fluorure de sodium.*

La même expérience réalisée sur le fluorure de sodium montre pour de faibles concentrations en fluorure de sodium une activation très faible de l'hydrolyse du β -glycérophosphate, et une action nulle dans le cas du pyrophosphate de sodium. L'effet noté sur la phosphoestérase peut tenir à l'élimination d'ions Ca^{++} du milieu, ces derniers étant tenus par certains auteurs comme inhibiteurs.

TABLEAU LIV. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na en présence de fluorure de sodium.*

NaF.....	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250	M/100	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.	4,2	5,7	6,05	5,45	6,45		5,35
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	6,05	6,05	5,75	5,8	5,9	6,6	6,1

c) *Acide cholique.*

L'étude de l'action de l'acide cholique a été faite sur l'enzyme purifié par une simple élution, et sur l'enzyme élué et précipité par l'acétone.

TABLEAU LV. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de sodium en présence d'acide cholique.*

I. — *Purification B* (adsorption et élution).

Acide cholique	0	M/2000	M/1000	M/500	M/250
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	74,0	74,0	70,0	75,0	76,0
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	26,6	25,2	25,2	26,6	27,3

II. — *Purification F* (adsorption et élution suivie de précipitation de l'élution par l'acétone à 75 p. 100).

Acide cholique	0	M/500	M/250	M/125	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	25,3	24,6	25,8	27,0	28,8
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	5,45	5,25	5,1	5,45	4,9

L'acide cholique n'a pas d'action sur l'hydrolyse du pyrophosphate par la phosphatase intestinale purifiée et il n'exerce sur la phosphomonoestérase (B) qu'un effet inhibiteur très faible, peut être même nul.

d) *Glycocolle.*

Le tableau suivant indique les résultats obtenus avec le glycocolle au cours de l'hydrolyse du β -glycérophosphate et du pyrophosphate de sodium par les enzymes intestinaux soumis à la purification (F) (précipitation acétonique de l'éluat).

TABLEAU LVI. — *Activité phosphatasique relative des enzymes intestinaux purifiés (F) sur le β -glycérophosphate et le pyrophosphate de Na en présence de glycocolle.*

Glycocolle	0	M/500	M/250	M/125	M/50
p. 100 de β -glycérophosphate hydrolysé.....	25,3	29,0	28,8	28,2	25,8
p. 100 de pyrophosphate hydrolysé.....	5,45	5,5	5,65	5,45	5,5

Le glycoColle a une action rigoureusement nulle sur l'hydrolyse du pyrophosphate de sodium par l'enzyme purifié. Sur celle du β -glycérophosphate de sodium, il présente *une très légère activation*, à concentration optima M/500.

e) Ion $PO_4^{=}$.

L'action de l'ion $PO_4^{=}$ n'a été étudiée que sur l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium par la phosphatase intestinale purifiée en présence de Mg^{++} ($qMg = 3$), car elle a déjà fait l'objet de nombreux travaux quand elle s'exerce sur la phosphoestérase et sur la pyrophosphatase.

TABLEAU LVII. — *Activité phosphatasique relative de l'enzyme soumis à la purification (B) sur l'adénylpyrophosphate de sodium en présence d'ions $PO_4^{=}$.*

mg. P p. 100 cm ³	0	1	2	5	10	20
p. 100 d'adénylpyrophosphate hydrolysé.	36,2	39,8	38,4	37,8	26,8	20,2

L'ion $PO_4^{=}$ agit sur l'hydrolyse de l'adénylpyrophosphate de sodium en provoquant une légère activation pour de faibles concentrations, et une forte inhibition pour des concentrations en P plus élevées.

5. ETUDE DE LA SPÉCIFICITÉ DE LA PHOSPHOESTÉRASE PURIFIÉE.

Il nous a semblé intéressant d'étudier les caractères de spécificité de l'enzyme purifié. Cette étude est basée sur l'action comparée de la préparation enzymatique sur les divers esters. Tous seront-ils hydrolysés identiquement, ou l'enzyme montrera-t-il une nette affinité pour l'un d'eux ? C'est ce que nous avons essayé de préciser au cours des expériences suivantes :

Nous avons fait un choix de divers esters phosphoriques purs : β -glycérophosphate de sodium, α -glycérophosphate de sodium, méthylphosphate de sodium, pyrophosphate de sodium, monophosphoglycérate de baryum, diphosphoglycérate de baryum, acide adénylique de levure, hexosemonophosphate de baryum. Par double décomposition, à l'aide du sulfate de sodium, le baryum de ces sels a été précipité, le liquide

surnageant obtenu après centrifugation constituant une solution du sel sodique de l'ester. Toutes ces solutions ont été ramenées à pH = 8,5 avant d'être employées. Les quantités de phosphore organique introduites dans les divers échantillons sont toutes égales entre elles, soit 0,4 mg. P par cm³ de mélange hydrolysant. La préparation enzymatique a été purifiée par adsorption sur kaolin, puis élution en milieu ammoniacal.

L'expérience consiste en la détermination des pourcentages d'hydrolyse de chacun de ces substrats à différents pH par l'enzyme purifié.

Les pH auxquels nous opérons vont de 8,25 à 9,24 ; le milieu étant tamponné à l'aide du tampon de KING. L'hydrolyse à 37° se poursuit vingt minutes, temps au bout duquel on déprotéinise à l'aide de 2 cm³ d'acide trichloracétique à 10 p. 100, on filtre, et l'on dose le phosphore libre par la méthode de BRIGGS au colorimètre de PULFRICH.

Nous avons dressé un tableau indiquant pour chacun de ces substrats les pourcentages d'hydrolyse en fonction du pH dans la zone de l'optimum.

TABLEAU LVIII. — *Hydrolyse comparée de divers esters par la phosphomonoestérase A₁ de l'intestin.*

pH	α -glycéro-phosphate	β glycéro-phosphate	Méthyl-phosphate	Monophos-phogly-cérate	Diphos-phogly-cérate	Acide adénylique	Hexosemono-phosphate
8,25	51,5	60,0	34,5	43,3	10,8	18,7	47,5
8,55	45,0	65,5	32,8	51,5	10,8	17,5	47,5
8,78	52,5	65,5	28,5	55,5	4,85	17,5	50,5
9,11	53,0	65,5	34,5	55,5	7,7	16,5	50,5
9,24	54,0	69,0	31,4	61,0	4,85	20,4	48,0

L'enzyme n'a pas marqué de spécificité pour un substrat, à l'exclusion des autres. Tous ces esters, ont été en partie plus ou moins hydrolysés. Le pourcentage d'hydrolyse varie avec le pH ; on retrouve ici l'optimum d'action de chacun de ces substrats.

La comparaison des pourcentages d'hydrolyse aux pH optima respectifs des différents esters, nous montre que c'est le β -glycérophosphate qui a subi la plus forte hydrolyse, puis viennent le monophosphoglycérate, l' α -glycérophosphate, l'hexosemonophosphate, le méthylphosphate, l'acide adénylique et le diphosphoglycérate.

Si nous comparons les pH correspondant à une hydrolyse maxima, on constate que le monophosphoglycérate et le diphosphoglycérate se différencient nettement par leurs pH optima d'hydrolyse ; l'optimum étant égal à pH 9,24 dans le cas du monophosphoglycérate, et 8,25 dans celui du diphosphoglycérate.

Nous nous sommes demandés, si au cours de l'hydrolyse, le diphosphoglycérate en se scindant en monophosphoglycérate ne verrait pas son optimum se déplacer des pH acides vers les pH alcalins ; c'est ce que nous avons essayé de réaliser à l'aide de l'expérience suivante :

Six échantillons de pH allant de 7,6 à 9,4 renferment chacun la même quantité d'enzyme et de diphosphoglycérate. Le milieu est tamponné ; chaque essai est ramené au même volume, et nous mesurons l'activité phosphatase de ces divers échantillons à différents temps variant depuis 30 minutes à 18 heures. Les données obtenues n'ont pas montré de décalage du pH optimum ; elles s'étagent parallèlement les unes aux autres. La même expérience réalisée sur le monophosphoglycérate a donné le même résultat. C'est donc bien une différence réelle du pH optimum d'action sur les deux substrats que nous avons constatée.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.

Dans l'ensemble, la purification ne modifie pas très sensiblement les caractères des phosphatases intestinales vis-à-vis de tous les corps ayant une action très nette sur les enzymes impurs ; les thiols demeurent des inhibiteurs de la phosphomonoestérase, mais leur action sur la pyrophosphatase devient plus faible et il est possible qu'une purification encore plus grande de cette dernière la rende insensible aux thiols. L'acide ascorbique conserve son caractère d'activateur de la phosphomonoestérase et, à dose faible, d'inhibiteur de la pyrophosphatase. De même, le cyanure de potassium demeure faiblement activateur de la pyrophosphatase à très faible concentration, et inhibiteur à forte concentration. Par contre, la purification renforce ou fait même parfois apparaître une faible inhibition de la phosphomonoestérase par l'oxalate de potassium et par l'acide cholique et une faible activation par le glycocolle. Ces derniers faits sont à retenir parce qu'ils

montrent combien la différenciation entre les phosphoestérases des divers organes basée sur leurs différences de sensibilité aux acides biliaires (BODANSKY) ou aux oxalates (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI) sont fragiles. Par ailleurs la complexité de l'action de corps comme KCN, l'acide ascorbique, dont l'action à très faible taux diffère de celle à concentration plus forte, persiste après purification, en sorte que l'on peut se demander si elle tient à l'insuffisance de celle-ci ou à un caractère propre à l'enzyme. Il est en effet possible que les corps tels que KCN ou l'acide ascorbique exercent deux actions distinctes, l'une en se combinant à un groupement actif de l'enzyme bloqué par de très petites quantités de réactif grâce à son affinité pour lui, l'autre en modifiant (réduction par exemple dans le cas de l'acide ascorbique) un second groupement de réactivité moindre. Mais, étant donnée la nature des produits donnés de cette double action, il est possible que la formation de complexes avec des impuretés métalliques, sinon avec un métal faisant partie du coenzyme, ne soit pas étrangère à leurs effets.

Enfin, il est très peu probable que l'état d'oxydoréduction du milieu joue un rôle *direct* dans l'activité des phosphatases de l'intestin. Les oxydants étudiés sont indifférents, sauf l'iode, inhibiteur général de très nombreux enzymes, et à cet égard l'absence d'action de l'acide monoiodacétique et de l'eau oxygénée permettent d'affirmer que les actions phosphatasiques ne sont pas liées à la présence d'un groupement -SH dans la molécule de l'enzyme. De plus les réducteurs n'ont pas une action systématique, l'acide ascorbique et les thiols exerçant une action inverse, les sulfites étant peu actifs. Il ne semble donc pas y avoir pour les enzymes que nous étudions de rH_2 optimum ou d'arrêt, comme REISS en a observé pour les systèmes protéolytiques cellulaires. L'action des thiols et de l'acide ascorbique paraît *spécifique* de chacun.

Enfin, on ne saurait trop insister sur le fait que la purification des phosphatases fait ressortir avec netteté que les systèmes enzymatiques des cellules ne peuvent pas être assimilés à des enzymes purs. Ils sont constitués par un ensemble d'enzymes et d'activateurs ou d'inhibiteurs. On ne connaîtra les caractères propres des enzymes qu'après les avoir séparés de ces derniers et la reconstitution des systèmes cellulaires avec des enzymes purifiés et des activateurs et des

inhibiteurs définis permettra seule de préciser et d'étudier de manière satisfaisante ces systèmes. L'activité d'un de ceux-ci dans les cellules est nécessairement liée à celle d'autres. Si l'état d'oxydoréduction ne joue, comme nous l'avons vu, aucun rôle direct sur l'action phosphatasique, il joue un rôle indirect important, puisque c'est de lui que dépend la position des équilibres : $\text{G-S-S-G} \rightleftharpoons 2 \text{G-SH}$ et : acide ascorbique $\rightleftharpoons$ acide déhydroascorbique. C'est ainsi que, par exemple, le glutathion réduit exerçant seul un effet inhibiteur important sur la phosphomonoestérase, son oxydation dans les cellules fait cesser cet effet, lequel s'exerce *spécifiquement* et n'est pas dû au rH_2 du milieu.

Résumé et conclusions générales.

1. La muqueuse intestinale (Chien) renferme un système phosphatasique complexe actif sur les monoesters et les diesters de l'acide orthophosphorique, sur les pyrophosphates et sur l'acide adénylpyrophosphorique. L'hydrolyse de ces corps est due à l'existence d'une phosphomonoestérase, d'une diestérase, d'une pyrophosphatase et, probablement, d'une adénylpyrophosphatase. Toutefois, si l'on peut considérer comme certaine la présence d'une adénylpyrophosphatase dans le foie, à partir duquel on prépare des extraits hydrolysant spécifiquement l'acide adénosinetriphosphorique à l'exclusion des pyrophosphates et des esters, il n'a pas été possible d'isoler cet enzyme de l'intestin, en sorte que la mise en liberté d'ions $\text{PO}_4^{=}$ aux dépens du substrat peut être, dans nos expériences, due à l'action combinée d'un ensemble de phosphatases.

2. La phosphomonoestérase intestinale répond au type A_1 de la classification de FOLLEY et KAY. Elle présente un pH optimum d'action à 9,2, dédouble les β -glycérophosphates préférentiellement aux α - et est activée par Mg^{++} ($q\text{Mg} = 2,5$ optimum). Elle a été purifiée par adsorption sur kaolin ou sur cholestérol à pH = 4,2 et élution à pH = 9,0 et par précipitation fractionnée à l'alcool ou à l'acétone. Elle est analogue à celle des os, du rein.

3. La pyrophosphatase intestinale a un pH optimum d'action à 8,0. Elle est activée par Mg^{++} ($q\text{Mg} = 2,5$ optimum). Elle ne peut pas être spécifiquement détruite par la chaleur ; aux divers pH et aux diverses températures, elle s'inactive simultanément à la phosphomonoestérase. Toutefois, l'adsorption de ces deux enzymes n'est pas rigoureusement parallèle ; en présence de cholestérol comme adsorbant, nous avons réussi à obtenir des éluats riches en phosphomonoestérase et fortement appauvris en pyrophosphatase.

4. La phosphodiesterase intestinale a un pH optimum d'action de 8,7 ; son adsorption est parallèle à celle de la phosphomonoesterase dans les conditions où nous nous sommes placés.

5. La cystéine, le glutathion (G-SH), l'hydrogène sulfuré sont inhibiteurs de la phosphomonoesterase brute ou purifiée, la cystine ayant une action moins importante. La pyrophosphatase est moins sensible à cet effet inhibiteur, surtout après purification ; le glutathion peut même, à forte concentration, être activateur.

6. L'acide ascorbique active faiblement la phosphomonoesterase brute ou purifiée ; il inhibe la pyrophosphatase, à faible dose plus qu'à concentration élevée. L'acide déhydroascorbique est indifférent.

7. Le cyanure de potassium, inhibiteur des deux enzymes à concentration relativement élevée est activateur de la pyrophosphatase à très faible concentration (M/2000).

8. L'eau oxygénée et l'acide monoiodacétique sont sans action importante sur les phosphatases intestinales, de même le ferricyanure de potassium et le perborate de sodium, tandis que l'iode les inactive. Toutefois ces corps peuvent exercer à très faible concentration une action favorable minime, que nous attribuons à leur effet sur des impuretés inhibitrices, en particulier des thiols.

9. Cet ensemble de constatations permet de considérer que l'hydrolyse enzymatique des esters et des pyrophosphates n'est pas directement en relation avec l'état oxydant ou réducteur du milieu.

En revanche, le rH_2 peut exercer une influence *indirecte* très importante sur elle, puisque certains corps très actifs sous forme réduite sont à peu près indifférents sous forme oxydée, sauf à concentration très élevée.

10. La purification des enzymes bruts fait apparaître ou renforce une faible sensibilité à l'action inhibitrice des oxalates et des acides biliaires et à l'effet activateur du glyco-colle, NaF demeurant sans action. Il est donc possible que la faible sensibilité aux premiers corps ne soit pas un caractère absolument spécifique de la phosphomonoesterase A_1 de l'intestin, celle des autres organes (os, foie, rein) étant plus fortement inhibée dans les mêmes conditions. De même l'exis-

tence de deux phosphatases alcalines dans l'intestin nous paraît hypothétique. Toutefois, une réponse à la question de l'existence d'un ou de plusieurs coenzymes, des phosphatases alcalines est la condition préalable à la discussion de cette opinion. Or, cette réponse n'a pas encore pu être donnée.

11. Les desmoenzymes de l'intestin (pyrophosphatase et monoestérase) sont en général moins sensibles aux agents d'activation ou d'inhibition que les lyoenzymes.

12. Le système phosphatasique de la muqueuse intestinale se distingue de celui de la plupart des organes et des humeurs par son extrême simplicité. Contrairement au rein, à la rate, au foie, aux globules blancs et rouges, au sérum, l'intestin ne renferme pas de phosphatases acides. Le seul système comparable à cet égard est le système phosphatasique des os, lequel s'en distingue par son extrême pauvreté en pyrophosphatase. Il est probable que ces particularités sont liées au rôle métabolique de la muqueuse intestinale plus qu'à l'hydrolyse digestive des esters phosphoriques, le pH du contenu intestinal étant faiblement acide.

Marseille, 24 juillet 1942.

Vu : *le Président,*

JEAN ROCHE.

Aix-en-Provence, 27 juillet 1942.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur,

PIERRE MARTINO.

Vu et approuvé : *le Doyen,*

LUCIEN CORNIL.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ALBERS (H.). — Phosphatasen, in *Handbuch der Enzymologie*, 2 vol., Akad. Verlagsges.; éd., Leipzig, 1940, 1545 p., pp. 408-479.
- 1 bis ALBERS (H.) und ALBERS (E.). — Ueber eine einfache Methode zur Darstellung hochaktiver Phosphatase-präparate aus tierischen Material. *Z. physiol. Chem.*, 1935, **232**, 189.
2. ASAKAWA (K.). — Ueber die fermentative Spaltung der verschiedenen Phosphorsäureester. *J. of Biochem.*, 1929, **11**, 143.
3. ASAKAWA (K.). — Nierenglycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1928, **10**, 157.
4. BAMANN (E.). — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch das Mangan Ion. *Naturw.*, 1940, **28**, 142; et *Ibid.*, 3405.
5. BAMANN (E.) und DIEDERICH (K.). — Abtrennung der begleitenden Esterase von der im sauren Gebiete wirksamen Leberphosphoesterase. IV. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, 1935, **68**, 6.
6. BAMANN (E.) und DIEDERICH (K.). — Trennung der beiden isodynamen Phosphoesterasen tierischer Organe durch ein selektives Inaktivierungsverfahren. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.
7. BAMANN (E.) und HEUMÜLLER. — Ueber die Aktivierung von Phosphatasen durch verschiedene Metallionen. *Naturw.*, 1940, **28**, 535.
8. BAMANN (E.) und RIEDEL (E.). — Ueber das Vorkommen zweier durch das pH. Wirkungsoptimum unterscheidbaren Phosphoesterasen in tierischen Organen. *Z. physiol. Chem.*, 1934, **229**, 125.
9. BAMANN (E.), RIEDEL (E.) und DIEDERICH (K.). — Zur Freilegung der Phosphoesterasen aus der Leber. (2 Abhandlung: Zur Kenntnis der Phosphatasen). *Z. physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.
10. BAMANN (E.) und SALZER (W.). — Ueber das Vorkommen einer zweiten im sauren Gebiet wirksamen Phosphoesterase in tierischen Organen. *Biochem. Z.*, 1936, **286**, 147.
11. BARRENSCHEEN (H. K.) und LANG (S.). — Zur Kenntnis der Adenosintriphosphatase der Leber. *Biochem. Z.*, 1932, **252**, 395.
12. BAUER (E.). — Beitrag zum Aktivierungsmechanismus der Phosphatasen. Pyrophosphatase II. *Z. physiol. Chem.*, 1937, **248**, 213.
13. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the phosphatasen II Inactivation and reactivation of the phosphatasen of animal organs. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 842.

14. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the phosphatases. III. on the mechanism of the inactivating action of sodium oxalate and of phosphates of the « alkaline » phosphatases of animal tissue. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1491.
15. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Studies on the phosphatases. I. The influence of some electrolytes on the phosphatases of animal tissue. Phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517.
16. BODANSKY (O.). — The accelerant effect of α -amino acids on the activity of bone phosphatase. *J. of Biol. Chem.*, 1936, **114**, 273.
17. BODANSKY (O.). — The effect of α -amino acids and magnesium on the activity of kidney and intestinal phosphatases. *J. of Biol. Chem.*, 1936, **115**, 101.
18. BODANSKY (O.). — Are the phosphatases of bone, kidney, intestine and serum identical? Use of bile acids in their differentiation. *J. of Biol. Chem.*, 1937, **118**, 341.
19. BODANSKY (S.), BAKWIN (R. M.), and BAKWIN (H.). — The distribution of phosphatases in the tissues of teleosts and elasmobranchs. *J. of Biol. Chem.*, 1931, **94**, 551.
20. BODNAR et KARELL. — Cité d'après FOLLEY et KAY [37]
21. CATTANEO (C.), GABRIELLI (M. C.) e SCOZ (G.). — Fosfatasi alcalina e attivazione in presenza dei sali di magnésio. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 17.
22. CEDRANGOLO (F.). — Glicerofosfatasi del cervello. *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1935, **10**, 374.
23. CEDRANGOLO (F.). — Phosphatase in subcutaneous canine tissue. *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 1936, **11**, 140.
24. CLOETENS (R.). — Identification de deux phosphatases « alcalines » dans les organes animaux. *Enzymolog.*, 1939, **6**, 46.
25. COMMON (R. H.). — Serum phosphatase in the Domestic fowl. *Naturw.*, 1934, **133**, 572.
26. CONTARDI (A.), RAVAZZONI (C.) et OSELLA (L.). — Fosfatasi e fosfatesi del latte. *Enzymolog.*, 1937, **3**, 170.
27. COURTOIS (J.). — Recherches sur les phosphatases végétales. *Thèse Doct. Sc. physiq.*, Paris 1938, 1 vol. Declume éd., Lons-le-Saunier, 206 p.
28. DAVIES (D. R.). — The phosphatase activity of spleen extracto. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 529.
29. DE CONCILIS. — Ricerche sulla fosfatasi retinica *Sperimentale*, 1934, **88**, 793.
30. DEMUTH (F.). — Ueber Phosphatstoffwechsel. I. Ueber Hexose phosphatase in menschlichen Organen und körperflüssigkeiten. *Biochem. Z.*, 1925, **159**, 415.
31. DEUTSCH (U.) and RÖSLER (K.). — Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. XVIII Mitteilung. Ueber den Nucleotidasegehalt einzelner Organe verschiedener Tiere. *Z. physiol. Chem.*, 1929, **185**, 146.
32. DMOCHOWSKI (A.). — Sur les phosphatases de l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 956.
33. EHRENSVARD (G.). — Studien ueber Phosphatase I. *Z. f. physiol. Chem.*, 1933, **217**, 274.

34. ERDTMAN (H.). — Glycerophosphatenspaltung durch Nierenphosphatase und ihre Aktivierung. *Z. f. physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.
35. ERDTMAN (H.). — Ueber Nierenphosphatase und ihre Aktivierung *Z. f. physiol. Chem.*, 1928, **177**, 211.
36. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — Recherches sur les Pyrophosphatases végétales. Etude comparative des cinétiques d'hydrolyse des acides pyrophosphorique et β -glycérophosphorique dans diverses conditions. *Enzymolog.*, 1937, **1**, 377.
37. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The Phosphatases. *Erg. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 159.
38. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The alkaline phosphomonoesterase of the mammary gland. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1837.
39. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The Phosphatases. *Tabul. Biol.*, 1937, **12**, 268.
40. GIRI (K. V.) and DATTA (N. C.). — Phosphatase of brain *Current. Science*, 1935, **4**, 324.
41. GIRI (K. V.). — Ueber Speichelposphatase. *Biochem. Z.*, 1936, **235**, 306.
42. GRAHAM et KAY. — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
43. HEYMANN (W.). — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
44. HOLMBERG (C. G.). — Ueber den Mechanismen bei der Mg. Aktivierung der Darmphosphatase. *Biochem. Z.*, 1935, **279**, 145.
45. HORII and TOMIKAWA. — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
46. HOVE (E.), ELVEHJEM (C. A.) and HART (E. B.). — The effect of zinc on alkaline phosphatases. *J. of biol. Chem.*, 1940, **134**, 425.
47. IMAGAWA. — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
48. INOUE (K.). — Die pH Abhängigkeit der Glycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1928, **10**, 133.
49. JACOBSEN (E.). — Studien ueber die Stabilität und Trennbarkeit einiger Phosphatasen. *Biochem. Z.*, 1933, **263**, 302.
50. JACOBSEN (E.). — Ueber eine spezifische Adenylpyrophosphatase. *Biochem. Z.*, 1931, **242**, 292.
51. JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalians tissues. III. Magnesium and the phosphatase system. *J. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.
52. KAY (H. D.). — Phosphatase in growth and disease of bone. *Physiol. Rev.*, 1932, **12**, 384.
53. KAY (H. D.). — Kidney phosphatase. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 791.
54. KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues A. The quantitative distribution of phosphatases in certain mammalian tissues. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 855.
55. KAY (H. D.). — Plasma phosphatase. II. The enzyme in disease, particularly in bone disease. *J. of Biol. Chem.*, 1930, **89**, 249.
56. KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. II. Pyrophosphatase. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1446.
57. KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. C. Synthetic activity of the phosphatase. *Biochem. J.*, 1928, **22**, 861.
58. KING (E. J.). — The enzymic hydrolysis of lecithin. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 799.

59. KING (E. J.) and DELORY (G. E.). — A carbonate veronal buffer solution covering pH 7,5 to 10,7. *Enzymolog.*, 1940, **8**, 4, 278.
- 59 bis KING (E. J.) and DELORY (G. E.). — Ascorbic acid and phosphatase activity. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.
60. KLEIN (W.) and ROSSI (A.). — Experimentelle Studien ueber den Nucleinstoffwechsel. XXXVI. Fermentative Untersuchungen ueber den Aufbau des Polynucleotidmoleküls. *Z. f. physiol. Chem.*, 1935, **231**, 104.
61. KOBAYASHI (H.). — Ueber die Glyzerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1927, **8**, 205.
62. KOBAYASHI (H.). — Kataphorese der glycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1928, **10**, 147.
63. KURATA (K.). — Ueber die fermentative Spaltung der Diphenylpyrophosphorsäure. *J. of Biochem.*, 1931, **14**, 25.
64. KUTSCHER (W.) und WÖRNER (A.). — Prostataphosphatase. 2. Mitteilung. *Z. f. physiol. chem.*, 1936, **239**, 109.
65. LATREILLE (M.). — Contribution à l'étude des phosphatases. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille 1938, 1 vol., Declume éd., Lons-le-Saunier.
66. LEVENE (P. A.) and DILLON (R. T.). — Intestinal Nucleotidase. *J. of Biol. chem.*, 1930, **88**, 753.
67. Mac FARLANE (M. G.), PATTERSON (L. B. M.) and ROBISON (R.). The phosphatase activity of animal tissues. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 720.
68. MACKENZIE (A. S.). — Phosphatase in Zähnen. *Brit. dent J.*, 1933, **54**, 153.
- 68 bis. MANIGAULT (P.). — Recherches sur le calcaire chez les Mollusques. Phosphatase et précipitation calcique. Histochemie du calcium. *Thèse Doct. Sc. nat.*, Paris, 1939; in *Ann. Inst. Océanog.*, 1939, **13**, fasc., 5, 331-426.
69. MARTLAND (M.) and ROBISON (R.). — The preparation and use of the bone phosphatase. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 237.
70. MICHAËLIS (L.). — Diethylbarbiturate buffer (veronal buffer). *J. of Biol. Chem.*, 1930, **87**, 34.
71. MORII (M.) et TAKABATAKE (Y.). — Phosphatasen menschlichen Uteringeschwülste. *Arb. 3 abt. anat. Inst. Kyoto. C.* N° 3, 1932, 46.
72. MUNEMURA (S.). — Ueber den Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *J. of Biochem.*, 1933, **17**, 343.
73. NORRIS (E. R.) et RAMA RAO (D. A. R.). — Phosphatases of marine invertebrates. *J. of Biol. Chem.*, 1935, **108**, 783.
74. OPPENHEIMER (C.). — Die Fermente und ihre wirkungen. *Supplement. Lief. 1 et 2*, W. Junk. éd., La Haye, 1935, pp. 98-170.
75. PELUZZO. — Presenza nei tessuti animali di una fosfatasi. *Riv. Patol. Sper.*, 1932, **8**, 240.
76. PETT (L. B.) and WYNNE (A. M.). — Studies on Bacterial Phosphatases. II. The Phosphatases of *Clostridium acetobutylicum* Weizmann and *Propionibacterium Jensenii* van Niel. *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1660.
77. POLICARD (A.), PÉHU (M.), ROCHE (J.), et BOUCOMONT. — Répartition histologique de la phosphatase dans la zone d'ossification des os longs chez l'enfant normal et rachitique. *Bull. Histol. appl.*, 1931, **8**, 171.

78. PYLE (J. J.), FISHER (J. H.), and CLARK (R. H.). — The effect of certain physiologically important materials upon Kidney phosphatase. *J. of Biol. Chem.*, 1937, **119**, 283.
79. RABATÉ (J.) et COURTOIS (J.). — Est-il possible d'utiliser le phlorhidzoside et les hétérosides voisins pour différencier les phosphatases. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 190.
80. REIS (J.). — Ueber die Aktivität der 5-Nukleotidase in den tierischen und menschlichen Geweben. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 183.
81. REIS (J.). — Specific phosphatase of nervous tissue. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 110.
82. ROBISON (R.). — Bone phosphatase. *Ergbn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 280.
83. ROCHE (J.). — Sur les phosphatases du sang. B. Spécificité des phosphatases du sang et de divers tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 841.
- 83 bis. ROCHE (J.). — Blood phosphatases. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1724.
84. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur les phosphatases du sang et de l'hémolymphe. *C. R. Soc. biol.*, 1934, **116**, 1033.
85. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la phosphatase des globules rouges. *C. R. Soc. biol.*, 1935, **119**, 1144.
86. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phosphoestérases. Contribution à l'étude des phosphomonoestérases et des phosphodiesterases du foie et du rein. *Enzymolog.*, 1937, **3**, 75.
87. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phosphatases (phosphomonoestérases A₁). *C. R. Soc. biol.*, 1937, **125**, 472.
88. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Sur le système phosphatase des hématies. *Enzymolog.*, 1939, **7**, 278.
- 88 bis. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Recherches sur l'ossification. VII. La phosphatase du squelette (os, dents, dermato-squelette) chez les Poissons osseux et cartilagineux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 143.
89. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LÉANDRI (A.). — Recherches sur l'ossification. III. La phosphatase des os longs aux diverses étapes de la croissance. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314.
90. ROCHE (J.) et MARTIN-POGGI (R.). — Recherches sur l'ossification. IX. Rôle de la vitamine C et de la phosphatase dans la formation de la substance osseuse, en particulier dans les cals de fracture. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1534.
91. ROSSI (A.). — Untersuchungen über die Phosphatasen der Knochen. *Boll. Soc. ital. di Biol. speriment.*, 1933, **8**, 714.
- 91 bis. SATOH (T.). — Ueber die Hydrolyse der Adenosintriphosphosäure durch Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. *J. of Biochem.*, 1935, **21**, 19.
92. SAVIANO (M.). — Ricerche sulle fosfatasi del tessuto adiposo. *Enzymolog.*, 1937, **2**, 43.
93. SCHÄFFNER (A.) und BAUER (E.). — Ueber Hefephosphatase (I. Mitteilung über die Enzyme der Gärung). *Z. f. physiol. Chem.*, 1935, **232**, 66.
94. SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI. — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
95. TAKAHASHI (H.). — Fermentative Dephosphorylierung der Nucleinsäure. *J. of Biochem.*, 1932, **16**, 463.

96. TAKAHASHI (H.). — Pyrophosphatase. *J. of Biochem.*, 1932, **16**, 447.
 97. TAKATA (H.). — Einfluss der Gallensäuren auf glycerophosphatase. *J. of Biochem.*, 1931, **14**, 61.
 98. THANNHÄUSER (S. J.), REICHEL (M.), GRATAN (S. F.) and MADDOCK (S. J.). — Studies on serum phosphatase activity. *J. of biol. Chem.*, 1937, **121**, 697, 709, 715, 721 et 727.
 99. UMENO (M.). — Studien über Phosphatase. I. Mitteilung über die Nierenphosphatase der verschiedenen Laboratoriumstiere. *Biochem. Z.*, 1931, **231**, 317.
 100. UMENO (M.). — Studien über Phosphatase. VI. Mitteilung : über das vorkommen der Phosphatase in der Galle und im Pankreassaft. *Biochem. Z.*, 1931, **231**, 346.
 101. UMENO (M.). — Studien über Phosphatase. IV. Mitteilung über die optimale und die zerstörungstemperatur der Nierenphosphatase. *Biochem. z.*, 1931, **231**, 334.
 102. UZAWA (S.). — Ueber die Kleienphospho-esterase. I et II. Ueber die Phosphomonoesterase und die Phospho-diesterase. *J. of Biochem.*, 1932, **15**, 1, 11, 19.
 103. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.) und SCHÄFFNER (A.). — Cité d'après FOLLEY et KAY [37].
 104. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.), SCHARIKOVA (R.) und SCHÄFFNER (A.). — Ueber den Einfluss von Sulfhydrylverbindungen auf enzymatische Prozesse. *Z. f. physiol. Chem.*, 1933, **214**, 75.
 105. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.), WEIL (L.) und PURR (A.). — Ueber die Steuerung des intracellulären Umsatzes von Eiweiss und Kohlenhydrat durch Sulfhydryl. *Z. f. physiol. Chem.*, 1933, **215**, 64.
 106. WESTENBRINK (H. G. K.). — Beitrag zur Kenntnis der Darmphosphatase. *Arch. Neerland. Physiol.*, 1935, **20**, 566.
-

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

Imprimé en France.

